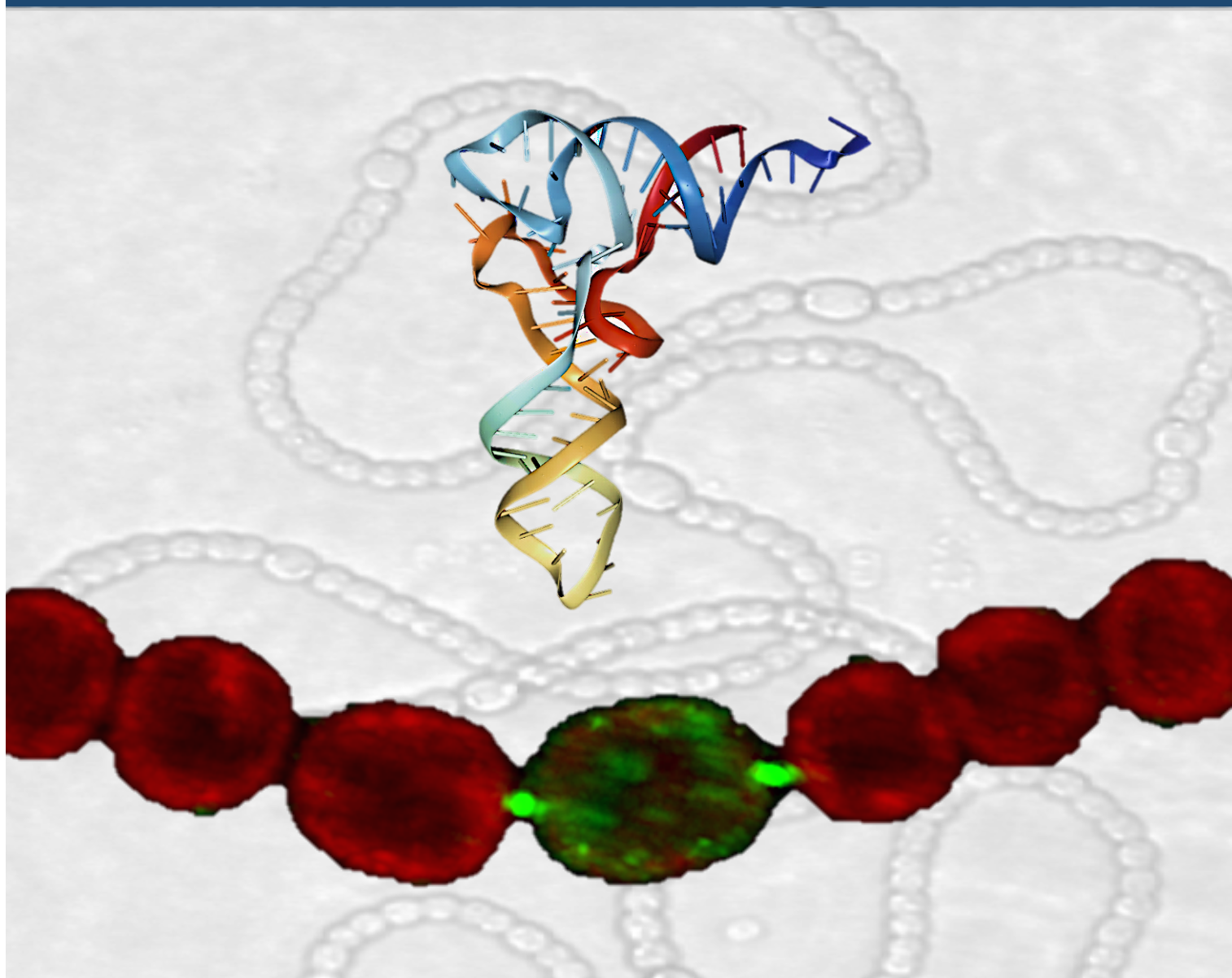


TESIS DOCTORAL

Caracteres específicos de la maquinaria traduccional de las cianobacterias



Javier Santamaría Gómez
Sevilla, 2017

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular
Universidad de Sevilla-CSIC

Caracteres específicos de la maquinaria traducciona de las cianobacterias

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Biología por el
licenciado Javier Santamaría Gómez



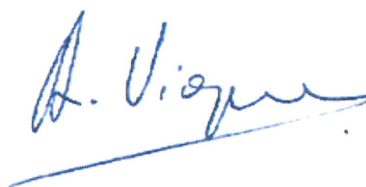
Sevilla, 2017



Director

Dr. Ignacio Luque Romero

Científico titular del CSIC



Tutor

Dr. Agustín Vioque Peña

Catedrático de la Universidad de Sevilla

A mi madre. Sé que estarías orgullosa de mí.

Quisiera comenzar este trabajo mostrando mi agradecimiento a todas las personas y entidades que de una u otra forma han hecho posible y más fácil la realización del mismo.

En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. Ignacio Luque, por haber confiado en mí y por haberme permitido entrar en el mundo de la Ciencia de su mano. Gracias por haberme enseñado tanto, por tu dedicación, tus consejos, tu optimismo y por tu paciencia infinita. Sin duda parte del mérito de este trabajo es tuyo.

Al Dr. Jesús Ochoa de Alda por su colaboración en los análisis bioinformáticos. A los Dres. Roque Bru y Susana Sellés por su ayuda con los análisis proteómicos. Al Dr. Jesús de la Cruz y la Dra. Olga Rodríguez por acogerme en su laboratorio y haberme ayudado con el aislamiento de polisomas, y al Dr. Vicente Mariscal por su inestimable colaboración en los ensayos de microscopía.

A mi familia, por todo su cariño y apoyo. A Nuria, por sus ánimos y comprensión cuando más lo he necesitado. Tenerte a mi lado es lo mejor que me ha pasado. A mis colegas de “los viernes al sol”, muchas gracias por haber hecho este viaje más llevadero.

Finalmente, quisiera agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de los proyectos BFU2010-19544 y BFU2013-44686P con los que ha sido posible financiar la realización de este trabajo.

índice

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Las cianobacterias	2
1.1.1.- Origen, evolución y clasificación de las especies cianobacterianas	3
1.1.2.- El genoma de las cianobacterias	6
1.1.3.- Rasgos metabólicos de las cianobacterias	6
1.1.3.1.- Asimilación de carbono, la fotosíntesis oxigénica	6
1.1.3.2.- Asimilación de nitrógeno	8
1.1.3.3.- Biosíntesis de ATP: la F_0F_1 ATP sintasa	9
1.1.4.- Diferenciación celular: el heterocisto	12
1.1.5.- Dinámica de la membrana tilacoidal en cianobacterias	14
1.1.5.1.- Biogénesis de los tilacoides en cianobacterias	14
1.1.5.2.- Reorganización de la membrana tilacoidal durante el desarrollo del heterocisto	16
1.1.5.3.- Dinámica de los componentes de la membrana tilacoidal	17
1.2.- La traducción en procariotas	19
1.2.1.- El ribosoma procariota	20
1.2.2.- Las etapas de la traducción	21
1.3.- Las aminoacil-tRNA sintetasas	24
1.3.1.- Generalidades	24
1.3.2.- Clasificación de las aaRSs	25
1.3.3.- Origen y evolución de las aaRSs	28
1.3.3.1.- Evolución de las aaRSs por adquisición de dominios	29
1.3.4.- La función de edición de las aaRSs. Los dominios de edición	32
1.3.5.- El dominio CAAD	34
1.3.6.- Funciones no canónicas de las aaRSs	37
1.3.6.1.- Funciones alternativas de las aaRSs	38
1.3.6.2.- Funciones alternativas de los aminoacil-tRNAs	40
1.3.7.- Formación de complejos por las aaRSs	41
1.4.- El RNA de transferencia	43
1.4.1.- Generalidades	43
1.4.2.- Síntesis y maduración del tRNA en procariotas	44
1.4.2.1.- Síntesis de los tRNAs	44
1.4.2.2.- Procesamiento de los pre-tRNAs	45
1.4.2.3.- Modificación post-transcripcional de los tRNAs	46
1.4.3.- Funciones no canónicas de los tRNAs	46

1.4.4.- Organización genómica de los genes de tRNA	48
OBJETIVOS	51
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1.-Organismos y condiciones de cultivo	54
2.1.1.-Cianobacterias	54
2.1.1.1.-Estirpes de cianobacterias utilizadas	54
2.1.1.2.- Medios y condiciones de cultivo	56
2.1.1.3.- Método de recogida y lavado de células	57
2.1.1.4.- Fraccionamiento celular de cianobacterias	58
2.1.2.- <i>Escherichia coli</i>	58
2.1.2.1.- Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas	58
2.1.2.2.- Medios y condiciones de cultivo	59
2.1.2.3.- Métodos de recogida y lavado de células	59
2.2.- Procedimientos genéticos	59
2.2.1.- Transferencia de DNA a <i>E. coli</i> mediante transformación	59
2.2.2.- Transferencia de DNA a <i>E. coli</i> mediante electroporación	60
2.2.3.- Transferencia de DNA a <i>Anabaena</i> mediante conjugación triparental	60
2.3.- Técnicas analíticas	62
2.3.1.- Manipulación y análisis del DNA	62
2.3.1.1.- Plásmidos utilizados	62
2.3.1.1.1.- Plásmidos utilizados como vectores de clonación o como ayudantes en experimentos de conjugación.....	62
2.3.1.1.2.- Plásmidos generados en este trabajo	63
2.3.1.2.- Aislamiento de DNA	65
2.3.1.3.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	66
2.3.1.4.- Determinación de la concentración de DNA	66
2.3.1.5.- Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	66
2.3.1.6.- Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	66
2.3.1.7.- Secuenciación del DNA	72
2.3.1.8.- Tratamientos enzimáticos del DNA	72
2.3.1.9.- Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA	73
2.3.2.- Manipulación y análisis del RNA	74
2.3.2.1.- Aislamiento de RNA de cianobacterias	74
2.3.2.2.- Determinación de la concentración de RNA	75
2.3.2.3.- Electroforesis de RNA en geles de agarosa	75

2.3.2.4.- Detección de secuencias de RNA mediante hibridación	
en filtro con sondas radiactivas (Northern blot)	76
2.3.2.4.1- Transferencia de RNA a filtros de nailon	76
2.3.2.4.2- Hibridación del RNA con sondas radiactivas	76
2.3.2.4.3- Detección de la radiactividad	77
2.3.2.5- RT-PCR	77
2.3.2.6.- 5'-RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	77
2.3.3.- Manipulación y análisis de proteínas	80
2.3.3.1.- Métodos de cuantificación de proteínas	80
2.3.3.2.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	
(SDS-PAGE)	81
2.3.3.3.- CN- <i>native</i>	81
2.3.3.4.- <i>Cross-linking in vivo</i> y purificación de proteínas	83
2.3.3.5.- Inmunodetección de proteínas (Western blot)	84
2.3.4.- Otras técnicas analíticas	85
2.3.4.1.-Determinación del contenido en pigmentos fotosintéticos	85
2.3.4.1.1.-Determinación del contenido en clorofila	85
2.3.4.1.2.-Determinación del contenido en ficobiliproteínas	86
2.3.4.1.3.-Determinación del contenido en carotenoides	86
2.3.4.2.-Ensayos de aminoacilación de tRNA	86
2.3.4.3.-Medida de la concentración intracelular de ATP	87
2.3.4.4.-Métodos de microscopía	88
2.3.4.4.1.-Microscopía confocal	88
2.3.4.4.2.-Microscopía de fluorescencia	88
2.3.4.4.3-Cálculo del coeficiente de difusión	89
2.3.4.5.-Aislamiento y análisis de polisomas	89
2.3.4.5.1.-Aislamiento de polisomas	89
a) <i>Cultivo y recogida de células</i>	89
b) <i>Preparación del lisado celular</i>	89
c) <i>Preparación de los gradientes de sacarosa</i>	90
d) <i>Separación de las muestras en gradientes</i>	
<i>de sacarosa</i>	91
e) <i>Fraccionamiento de los gradientes de sacarosa</i>	91
2.3.4.5.2.-Análisis de polisomas	91
a) <i>Extracción de RNA de las fracciones polisómicas</i>	91
b) <i>Análisis del RNA de las fracciones polisómicas</i>	
<i>por RT-PCR</i>	92
2.3.4.6.- Espectrometría de masas	94

2.3.4.7.- Análisis bioinformático	94
3.- CAPÍTULO I. Las aaRSs de cianobacterias: localización subcelular y formación de complejos	95
3.1.- Resultados	97
3.1.1.- Detección del dominio CAAD en nuevas aaRSs. Distribución de aaRS ^C en el árbol de especies de cianobacterias	99
3.1.2.- Localización subcelular de aaRSs ^C	101
3.1.3.- Localización subcelular de las aaRSs de <i>Anabaena</i>	102
3.1.4.- Análisis de la formación de complejos por las aaRSs de <i>Anabaena</i>	106
3.1.5.- Análisis de la interacción ValRS-F ₀ F ₁ -ATP sintasa	111
3.1.5.1.- Ensayos de co-purificación recíproca	111
3.1.5.2.- Ensayos de CN- <i>native</i>	112
3.1.5.3.- Localización subcelular de la proteína de fusión AtpA-GFP	115
3.1.6.- Consecuencias fisiológicas de la interacción ValRS-F ₀ F ₁ -ATP sintasa	116
3.2.- Discusión	119
3.2.1.- Adquisición del dominio CAAD por las aaRSs de cianobacterias a lo largo de la evolución	121
3.2.2.- Localización subcelular de las aaRSs en cianobacterias	123
3.2.3.- Análisis del patrón de interacciones de las aaRSs de <i>Anabaena</i>	124
3.2.4.- Consecuencias fisiológicas de la interacción entre ValRS y F ₀ F ₁ -ATP sintasa	125
4.- CAPÍTULO II. Análisis de la relocalización subcelular de ValRS^C durante la diferenciación de heterocistos en <i>Anabaena</i>	127
4.1.- Resultados	129
4.1.1.- Expresión de la fusión GFP-CAAD bajo el control de promotores específicos de células vegetativas o heterocisto	134
4.1.2.- Análisis de la recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo en el heterocisto de <i>Anabaena</i>	137
4.2.- Discusión	141
5. CAPÍTULO III. Análisis funcional del operón de genes de tRNAs del plásmido delta de <i>Anabaena</i>	149
5.1.- Resultados	151
5.1.1.- Consecuencias fisiológicas de la expresión de los tRNAs del operón <i>trn</i> ...	153
5.1.1.1.- Análisis del fenotipo de la estirpe JS75	155
5.1.1.1.1.- Composición de pigmentos	155

5.1.1.1.2- Sensibilidad a aminoácidos	158
5.1.2.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i>	161
5.1.2.1.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> en respuesta al estrés lumínico	161
5.1.2.2.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a agentes que inducen estrés oxidativo	162
5.1.2.3.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a estrés nutricional	163
5.1.3.- Análisis de la regulación del operón <i>trn</i>	165
5.1.3.1.- Identificación y caracterización de promotores	165
5.1.3.2.- Co-regulación del gen <i>all8564</i> con el operón de tRNAs	167
5.1.3.3.- Identificación de reguladores	168
5.1.3.4.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> en presencia de inhibidores de la traducción	171
5.1.4.- Análisis del mecanismo de acción de los tRNAs codificados en el operón <i>trn</i>	174
5.2.- Discusión	179
5.2.1.- Presencia de agrupamientos de genes <i>trn</i> en las cianobacterias	181
5.2.2.- Los tRNAs del operón se acumulan en condiciones de estrés	183
5.2.3.- Regulación de la expresión de los tRNAs del operón	185
5.2.4.- Consecuencias fisiológicas de la expresión de los tRNAs del operón	188
6.- CONCLUSIONES	193
7.- BIBLIOGRAFÍA	195
8.- ARTÍCULOS	219

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.- Cianobacterias representativas de cada una de las secciones de la clasificación morfológica de Rippka	4
Figura 1.2.- Árbol filogenético de las cianobacterias	5
Figura 1.3.- Estructura de la F ₀ F ₁ ATP-sintasa procariota	11
Figura 1.4.- Estructura del heterocisto de <i>Anabaena</i>	14
Figura 1.5.- Modelo propuesto para la síntesis de membrana tilacoidal	16
Figura 1.6.- Esquema de los componentes de la cadena de transporte de electrones fotosintética y respiratoria presentes en la membrana tilacoidal de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	17
Figura 1.7.- Estructura del ribosoma procariota	20
Figura 1.8.- El ciclo del ribosoma	23
Figura 1.9.- Reacción de aminoacilación	24
Figura 1.10.- Dominios adicionales identificados en las aaRSs de humanos	30
Figura 1.11.- Relación entre la adquisición de dominios en aaRSs de eucariotas y el incremento en la complejidad de los organismos	31
Figura 1.12.- Edición de la LeuRS de <i>E. Coli</i>	34
Figura 1.13.- El dominio CAAD de las aaRSs de cianobacterias	35
Figura 1.14.- Funciones no canónicas de las aaRSs	38
Figura 1.15.- Complejos multisintetasa en los tres dominios de la vida	42
Figura 1.16.- Estructura secundaria y terciaria del tRNA	44
Figura 1.17.- Modificaciones del tRNA	46
Figura 1.18.- Distribución de agrupamientos <i>trn</i> en arqueas y bacterias	49
Figura 1.19.- Operón <i>trn</i> del plásmido delta de <i>Anabaena</i>	50
 Figura 2.1.- Esquema explicativo de la técnica de 5'-RACE	79
Figura 2.2.- Esquema del montaje empleado para la formación de gradientes de sacarosa	90
 Figura 3.1.1.- Presencia del dominio CAAD en las aaRSs de cianobacterias	100
Figura 3.1.2.- Localización subcelular de la LeuRS ^C de <i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106 fusionada a GFP mediante expresión ectópica en <i>Anabaena</i>	102
Figura 3.1.3.- Localización subcelular de las aaRSs de <i>Anabaena</i>	104
Figura 3.1.4.- Localización de las aaRSs en el heterocisto de <i>Anabaena</i>	105
Figura 3.1.5.- Purificación de las fusiones GFP-aaRSs solubles de <i>Anabaena</i>	107
Figura 3.1.6.- Purificación de la fusión GFP-ValRS ^C en <i>Anabaena</i>	109
Figura 3.1.7.- Purificación de la fusión CAAD-GFP en <i>Anabaena</i>	110
Figura 3.1.8.- Purificación de la fusión ValRS ^C -His en <i>Anabaena</i>	110
Figura 3.1.9.- Co-purificación de la fusión AtpA-GFP con otras subunidades de la ATP sintasa y con ValRS ^C	112
Figura 3.1.10.- Optimización de la concentración de digitonina en los ensayos de CN-native	113
Figura 3.1.11.- Análisis de la interacción ValRS ^C -ATP sintasa mediante CN-native	114
Figura 3.1.12.- Localización subcelular de AtpA-GFP	115
Figura 3.1.13.- Medidas de la actividad ValRS en fracciones celulares de <i>Anabaena</i> silvestre y el mutante Δ^C	116
Figura 3.1.14.- Optimización de la cantidad de biomasa a usar en los ensayos de medida de la concentración intracelular de ATP	117
Figura 3.1.15.- Concentración intracelular de ATP en <i>Anabaena</i> silvestre y el mutante Δ^C bajo condiciones de escasez de nitrógeno	118
Figura 3.2.1.- Análisis filogenético de CURT1/CAAD en cianobacterias	122
 Figura 4.1.1.- Dinámica de relocalización de GFP-CAAD en el heterocisto de <i>Anabaena</i>	132
Figura 4.1.2.- Detalle de la distribución de la proteína GFP-CAAD en los polos del heterocisto	133
Figura 4.1.3.- Ilustración representativa de las hipótesis sobre el mecanismo de relocalización de ValRS ^C en el heterocisto de <i>Anabaena</i>	135
Figura 4.1.4.- Localización en el heterocisto de la proteína GFP-CAAD	136
Figura 4.1.5.- Análisis FRAP en heterocistos de <i>Anabaena</i>	139
Figura 4.2.1.- Metamorfosis del heterocisto durante el proceso de diferenciación	143
 Figura 5.1.1.- Comprobación de la estructura cromosómica del mutante JS75	154
Figura 5.1.2.- Análisis de la expresión de los tRNAs del operón en el mutante JS75	155
Figura 5.1.3.- Pigmentación de cultivos de <i>Anabaena</i> y del mutante JS75	156
Figura 5.1.4.- Espectro de absorbancia y medida de pigmentos de <i>Anabaena</i> y el mutante JS75	157
Figura 5.1.5.- Análisis de la expresión de <i>asr4517</i> y <i>asr8504</i> en <i>Anabaena</i> y el mutante JS75	158
Figura 5.1.6.- Análisis de la secuencia y estructura secundaria de los tRNAs de leucina de <i>Anabaena</i>	159

Figura 5.1.7.- Crecimiento de <i>Anabaena</i> silvestre y el mutante JS75 en medio sólido con concentraciones <i>quasi</i> -tóxicas de aminoácidos	160
Figura 5.1.8.- Expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a diferentes intensidades de luz	162
Figura 5.1.9.- Análisis de expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a la oscuridad	162
Figura 5.1.10.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a agentes oxidantes	163
Figura 5.1.11.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a la limitación de nitrógeno	164
Figura 5.1.12.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a la limitación de carbono	164
Figura 5.1.13.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a la deficiencia de zinc	165
Figura 5.1.14.- Identificación de promotores por 5'-RACE	166
Figura 5.1.15.- Secuencia de los promotores identificados en el operón <i>trn</i>	167
Figura 5.1.16.- Perfil de expresión del gen <i>all8564</i> y el operón <i>trn</i>	167
Figura 5.1.17.- Análisis de la implicación de Zur en la regulación de la expresión del operón <i>trn</i>	168
Figura 5.1.18.- Expresión del operón <i>trn</i> en <i>Anabaena</i> y el mutante CSS74	169
Figura 5.1.19.- Crecimiento de <i>Anabaena</i> y del mutante CLUSTER-CK1 en ausencia de carbono	170
Figura 5.1.20.- Expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a la presencia de cloranfenicol y espectinomicina	171
Figura 5.1.21.- Análisis de la expresión del operón <i>trn</i> y de genes de tRNAs del cromosoma en respuesta a la presencia de antibióticos	172
Figura 5.1.22.- Análisis comparativo de la expresión del operón <i>trn</i> en respuesta a distintos estímulos.....	173
Figura 5.1.23.- Aislamiento de polisomas de <i>E. Coli</i>	174
Figura 5.1.24.- Aislamiento de polisomas de <i>Anabaena</i>	175
Figura 5.1.25.- Tratamiento con RNasa de extractos de <i>Anabaena</i>	175
Figura 5.1.26.- Análisis de la presencia de los tRNAs del operón <i>trn</i> en polisomas	177
Figura 5.2.1.- Presencia de agrupamientos de genes <i>trn</i> en las cianobacterias	183
Figura 5.2.2.- Alineamiento de los promotores del operón <i>trn</i>	185
Figura 5.2.3.- Posible modelo de regulación de la expresión del operón <i>trn</i>	187

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.- Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetasas	27
Tabla 2.1.- Estirpes mutantes derivadas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 utilizadas	54-56
Tabla 2.2.- Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas	59
Tabla 2.3.- Plásmidos utilizados como vector de clonación o como ayudantes en experimentos de conjugación	62-63
Tabla 2.4.- Plásmidos generados en este trabajo	63-65
Tabla 2.5.- DNA polimerasas utilizadas	67
Tabla 2.6.- Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR	67-71
Tabla 2.7.- Oligonucleótidos empleados para la generación de sondas radiactivas	73-74
Tabla 2.8.- Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de 5'-RACE	79-80
Tabla 2.9.- Composición de los tampones empleados para elaborar los gradientes de sacarosa	90
Tabla 2.10.- Oligonucleótidos empleados para el análisis de polisomas mediante RT-PCR	92-93
Tabla 3.1.1.- Especies de cianobacterias que contienen 2 aaRS ^C	99
Tabla 3.1.2.- Número de genomas que codifican cada aaRS ^C	99
Tabla 3.1.3.- Listado de proteínas que co-purifican con las aaRSs solubles de <i>Anabaena</i>	107-108

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
μE	microEinstein
aa	Aminoácido
aaRS	Aminoacil-tRNA sintetasa
aaRS ^c	Aminoacil-tRNA sintetasa con dominio CAAD
AMP	Adenosina monofosfato
Ap	Ampicilina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>Amerycan Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basil Local Alignment Search Tool</i>
bp	Par de bases (<i>base pair</i>)
BSA	Seroalbúmina bovina
CAAD	<i>Cyanobacterial Aminoacyl-tRNA synthetase Appended Domain</i>
CCMEE	Colección de Cultivos microbianos de ambientes extremos (<i>Culture Collection of Microorganisms from Extreme Environments</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cm	Cloranfenicol
CTP	Citidina trifosfato
DEPC	Diethylpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRAP	Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	Ácido N-2 hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of flight</i>
Mb	Megabase
MBIC	Colección de Cultivos del Instituto de Biotecnología Marina (<i>Marine Biotechnology Institute Culture Collection</i>)
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MV	Metil viológeno
NIES	Colección de Cultivos del Instituto Nacional de Estudios Medioambientales(<i>National Institute for Environmental Studies</i>)
Nm	Neomicina
nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
p/v	Relación peso/volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
PCC	Colección de Cultivos Tipo del Instituto Pasteur (<i>Pasteur Culture Collection</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
P _i	Fosfato inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilfluoruro
PP _i	Pirofosfato

PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sep	O-fosfoserina
Sm	Estreptomina
Sp	Espectinomicina
TAP	Fosfatasa alcalina de tabaco
TBE	Tris-borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metilendiamina
TES	Ácido N'tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanol-sulfónico
TPEN	N, N, N', N'-tetra(piridimetil)etilendiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
tsp	Sitio de inicio de la transcripción (<i>transcription start point</i>)
TTP	timidina trifosfato
U	Unidad de actividad enzimática
UTR	Región del mRNA no traducida (<i>untranslated region</i>)
v/v	Relación volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

1 INTRODUCCIÓN

1.1.- Las cianobacterias

Las cianobacterias constituyen un grupo monofilético de eubacterias Gram-negativas de elevada complejidad morfológica. La característica principal de los integrantes de este *phylum* estriba en contar con un aparato fotosintético similar en función y estructura al de las plantas superiores, lo cual les permite llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica (DeRuyter & Fromme, 2008). De hecho, en la actualidad está ampliamente aceptada la hipótesis de que los cloroplastos de algas y plantas se originaron por un evento de endosimbiosis por el que una cianobacteria se estableció en el citoplasma de otra (Margulis, 1975; Ochoa de Alda *et al.*, 2014). A diferencia de las algas y plantas superiores, la mayoría de cianobacterias carecen de clorofila *b* (Stanier & Cohen-Bazire, 1977) y cuentan en las membranas tilacoidales con ficobilisomas como pigmentos antena.

Las cianobacterias se engloban en el grupo de las bacterias Gram-negativas por poseer una membrana externa que envuelve a una capa de peptidoglicano y define un espacio periplásmico entre ésta y la membrana plásmática (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). No obstante, un aspecto que hace a las cianobacterias organismos únicos y más complejos entre las bacterias Gram-negativas es que cuentan además con un sistema interno de membranas tilacoidales donde residen los complejos fotosintéticos y los componentes de la cadena respiratoria (Mullineaux, 2014).

Las cianobacterias han tenido una importancia crucial en la biogeoquímica del planeta Tierra y en la evolución de la vida en él, pues fueron los primeros organismos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, lo que produjo una acumulación de oxígeno en la atmósfera durante el periodo Precámbrico. Ello derivó en la transformación de la atmósfera terrestre primitiva, de naturaleza reductora, hacia la actual, de naturaleza oxidante (Whitton & Potts, 2002). En la actualidad, las cianobacterias juegan un papel esencial a escala planetaria en el mantenimiento del ciclo del carbono, nitrógeno y oxígeno, pues contribuyen significativamente a la producción primaria del planeta debido a la fijación de carbono y nitrógeno especialmente en los océanos donde son uno de los principales constituyentes del fitoplancton (Montoya *et al.*, 2004).

El estilo de vida fotoautótrofo de las cianobacterias les ha permitido conquistar diversos nichos ecológicos iluminados, que van desde océanos, suelos y aguas continentales hasta ambientes extremos como la tundra polar, fuentes termales o las costras microbianas de ambientes desérticos. Además, pueden vivir estableciendo relaciones de simbiosis con otras especies de hongos, plantas, esponjas y protistas (Adams, 2000; Meeks & Elhai, 2002). Se puede decir por tanto que la actividad biológica de las cianobacterias ha sido y es

determinante para la configuración de la actual biodiversidad en nuestro planeta.

1.1.1.- Origen, evolución y clasificación de las especies cianobacterianas.

En el Proterozoico temprano, hace unos 2500-2300 millones de años, tuvo lugar un rápido incremento de los niveles de oxígeno atmosférico, un fenómeno conocido como el “Gran Evento de Oxidación” (GOE) (Bekker *et al.*, 2004). Puesto que las cianobacterias fueron los primeros organismos que llevaron a cabo la fotosíntesis oxigénica, se les considera las responsables del GOE. Se estima que la génesis de este *phylum* tuvo lugar en la Era Arqueozoica, unos 500 millones de años antes del GOE, hace aproximadamente 3000 millones de años (Schirrmeister *et al.*, 2013).

Desde el origen de las cianobacterias, la complejidad de los genomas ha ido evolucionando para adaptarse a los diversos hábitats. Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de un número de genes (a los que se hace referencia como *core*) que están altamente conservados en todas las cianobacterias y que contienen genes básicos para la formación de la maquinaria fotosintética y los ribosomas, así como genes implicados en la síntesis de ATP, síntesis de clorofila y en el ciclo de Calvin. Otros genes específicos de algunos géneros y especies se han adquirido principalmente por transferencia horizontal o por fenómenos de duplicación y deriva génica (Shi & Falkowski, 2008). En la evolución de las cianobacterias se observa un paralelismo entre el aumento en la complejidad genómica y el incremento en la biodiversidad. La evolución temporal de los diferentes linajes cianobacterianos sigue siendo un tema de cierta controversia. No obstante, parece ampliamente aceptada la hipótesis de que el origen de la multicelularidad en estos organismos fue un evento muy temprano que tuvo lugar coincidiendo o de forma previa al GOE. Se considera probable que varios cientos de millones de años antes del GOE habría surgido la multicelularidad en cianobacterias, lo cual les habría aportado una ventaja evolutiva derivada de las mejoras adaptativas de esta nueva organización celular. Este éxito evolutivo habría provocado una rápida diversificación y un incremento en la abundancia cianobacteriana, causando el GOE por la acumulación de oxígeno atmosférico resultado de la actividad metabólica de estos organismos (Schirrmeister *et al.*, 2015). El carácter multicelular se ha conservado hasta la actualidad en numerosas especies pero se ha perdido en algunos linajes de los que provienen las especies unicelulares actuales. Únicamente el género *Spirulina* habría recuperado el carácter multicelular tras haberlo perdido previamente (Schirrmeister *et al.*, 2011).

A pesar de ser un grupo monofilético, las cianobacterias exhiben una amplia diversidad morfológica. Esta característica, junto con el plano de división celular, sirvió a Rippka *et al.*

como criterio para establecer un sistema de clasificación taxonómica mediante el cual se agrupaban las distintas especies en 5 secciones (Rippka *et al.*, 1979): sección I, constituida por cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión binaria o gemación, a la que pertenecen géneros como *Synechococcus* o *Synechocystis*; sección II, cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión múltiple y/o binaria, en la que se encuentran géneros como *Chroococcidiopsis* o *Pleurocapsa*; sección III, que engloba estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos, a la que pertenecen los géneros *Spirulina* y *Oscillatoria*; sección IV, constituida por cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos que se dividen en un único plano, a la que pertenecen géneros como *Anabaena*, *Nostoc* o *Tolypothrix*; sección V, conformada por cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos que se dividen en más de un plano, a la que pertenecen géneros como *Fischerella* o *Scytonema*. En la figura 1.1 se muestran imágenes al microscopio óptico de ejemplos de cianobacterias de cada una de las secciones de la clasificación de Rippka.

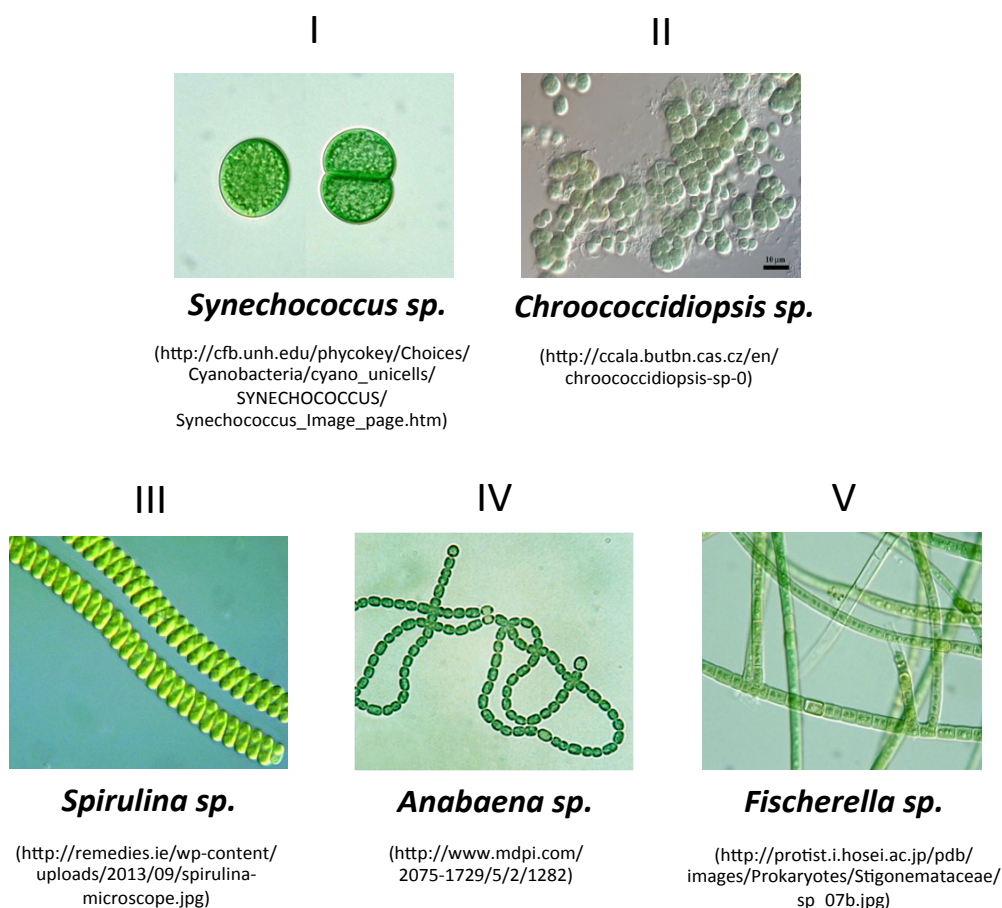


Figura 1.1.- Cianobacterias representativas de cada una de las secciones de la clasificación morfológica de Rippka.

Aunque este sistema sigue siendo de gran utilidad, los análisis filogenéticos han demostrado que la clasificación de Rippka no es fiel a la filogenia. Si bien, está ampliamente

demostrado que las secciones IV y V de Rippka representan grupos filogenéticamente coherentes (Schirrmeyer *et al.*, 2015; Sánchez-Baracaldo, 2015).

Recientemente Schirrmeyer *et al.*, han publicado un exhaustivo análisis filogenético en el que se muestra que la mayor parte de las cianobacterias se agrupan en 6 clados (Figura 1.2). Como puede observarse en la figura, las secciones IV y V de Rippka son las únicas morfológica y genómicamente coherentes, indicando un origen monofilético (Schirrmeyer *et al.*, 2015). A pesar de los esfuerzos, la distribución de las especies de cianobacterias en árboles filogenéticos es aún controvertida (Schirrmeyer *et al.*, 2013; Shih *et al.*, 2013; Ochoa de Alda *et al.*, 2014).

La cianobacteria utilizada como organismo modelo en este trabajo ha sido *Anabaena* sp. PCC 7120 (en adelante, *Anabaena*) también conocida como *Nostoc* sp. PCC 7120. Se engloba en la sección IV de la clasificación de Rippka, es decir, se trata de una cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos cuyas células se dividen en un solo plano, y forma parte del clado número 5 de la clasificación de Schirrmeyer.

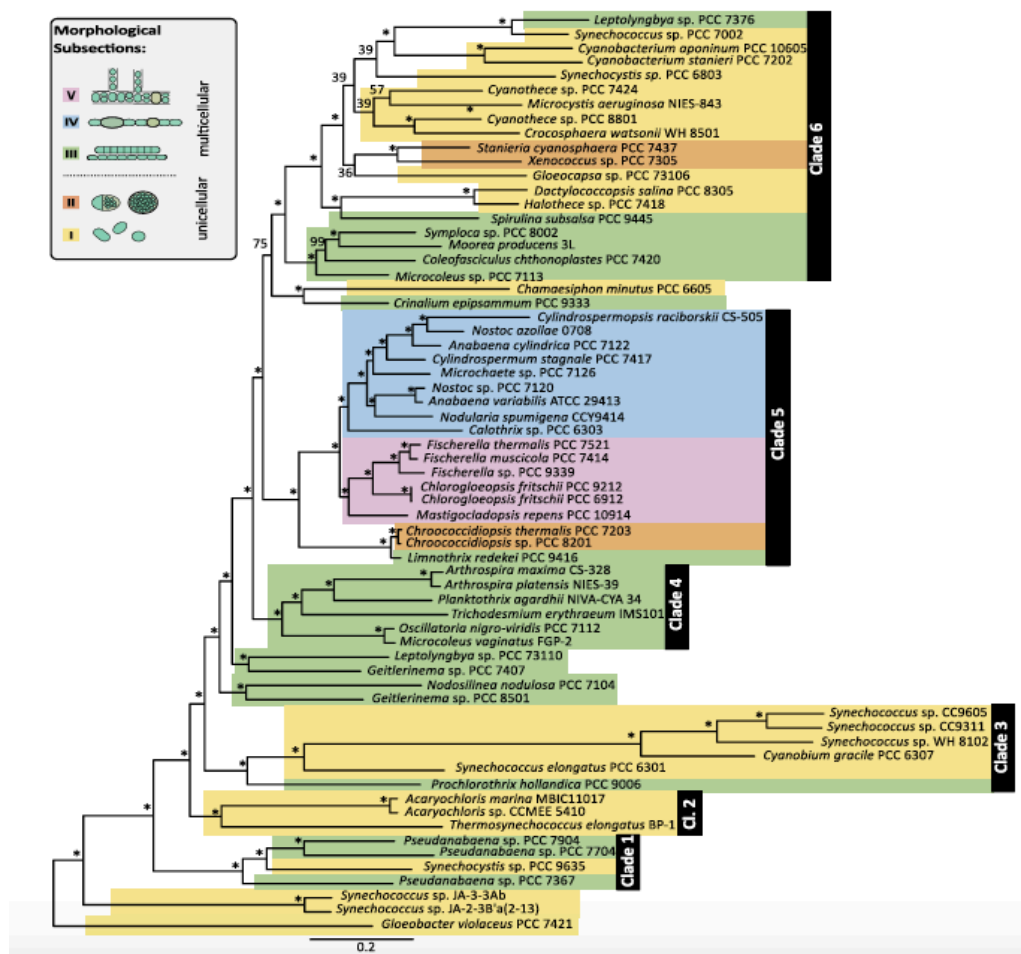


Figura 1.2.- Árbol filogenético de las cianobacterias. Clasificación de las cianobacterias según Schirrmeyer *et al.* Las especies aparecen coloreadas según la sección a la que pertenecen en la clasificación morfológica de Rippka. En el recuadro superior se indica el código de colores utilizado. Reproducción de una figura de Schirrmeyer *et al.*, 2015.

1.1.2.- El genoma de las cianobacterias

La heterogeneidad en el *phylum Cyanobacteria* es también apreciable en la diversidad genómica entre las distintas especies. El contenido en G+C de los diferentes linajes varía entre el 32% y el 71% (Herdman *et al.*, 1979) y el tamaño de los genomas cianobacterianos oscila entre las 9.2 Mb de *Nostoc punctiforme* y las 1.66 Mb de *Prochlorococcus* MED4, considerado el tamaño genómico mínimo requerido para un organismo fotosintético de vida libre (Rocap *et al.*, 2003). Igualmente, existe amplia variabilidad en la organización genómica, encontrándose especies como *Gloeobacter violaceus* o las cianobacterias de los géneros *Prochlorococcus* y los *Synechococcus* marinos que poseen un único cromosoma circular, mientras que en otras especies el contenido genómico se distribuye en un cromosoma circular y varios plásmidos de menor tamaño (Hess, 2011). En cuanto al número de copias del cromosoma, existen especies monoploides, oligoploides y poliploides con hasta 100 copias del cromosoma por célula (Griese *et al.*, 2011).

El genoma de *Anabaena* tiene 7.2 Mb distribuidas entre un cromosoma circular de 6.4 Mb y 6 plásmidos (denominados de mayor a menor tamaño como α , β , γ , δ , ϵ y ζ) cuyo tamaño varía entre las 5.5 Kb y las 408 Kb (Kaneko *et al.*, 2001).

1.1.3.- Rasgos metabólicos de las cianobacterias

1.1.3.1.- Asimilación de carbono, la fotosíntesis oxigénica

Contrastando con su diversidad morfológica, las cianobacterias son un grupo bastante homogéneo desde el punto de vista metabólico. La característica más relevante es que todas las cianobacterias son capaces de emplear energía lumínica para reducir (fijar) fuentes de carbono inorgánico (CO_2 o HCO_3^-) mediante fotosíntesis. La fotosíntesis es un proceso bioenergético que surgió muy pronto en la historia de la Tierra. Desde hace millones de años, la conversión de la energía lumínica en energía química por los organismos fotosintéticos ha cambiado radicalmente la vida en la Tierra. Los primeros organismos fotosintéticos fueron, casi con total seguridad, procariotas que practicaban una fotosíntesis anoxigénica (Nowicka & Kruk, 2016). Las cianobacterias fueron los primeros organismos en utilizar dos fotosistemas en serie, denominados PSI y PSII, lo cual les permitió generar el potencial electroquímico suficiente para utilizar agua como donador de electrones y producir oxígeno como subproducto de la fotosíntesis, motivo por el cual se considera a las cianobacterias los organismos inventores de la fotosíntesis oxigénica (Hohmann-Marriott & Blankenship, 2011).

En la actualidad la fotosíntesis oxigénica la realizan cianobacterias, algas y plantas superiores. En todos estos organismos el proceso fotosintético ocurre, en esencia, del mismo modo. No obstante, las cianobacterias cuentan con características particulares entre los organismos que desarrollan la fotosíntesis oxigénica. Una de ellas radica en la composición del aparato fotosintético, pues cuentan en la membrana tilacoidal con ficobilisomas como pigmentos antena. Los ficobilisomas son macrocomplejos formados por ficobiliproteínas unidas a pigmentos cuya función consiste en captar la luz y transferir la energía lumínica a los fotosistemas I y II (Liu *et al.*, 2013; Bailey & Grossman, 2008). Cabe destacar que las ficobiliproteínas pueden llegar a representar el 40-50% de la proteína celular por lo que constituyen importantes reservas de nitrógeno y carbono. Otra singularidad de las cianobacterias es la capacidad de adaptar la composición de su aparato fotosintético a las condiciones lumínicas del ambiente mediante un proceso denominado fotomorfogénesis. Este nombre engloba distintos fenómenos que permiten a las cianobacterias regular la cantidad de clorofila, el ratio PSI/PSII o modificar la composición de pigmentos de los ficobilisomas en función de la longitud de onda o intensidad de la luz. A este último fenómeno se conoce como “adaptación cromática” (Montgomery, 2016; Gutu & Kehoe, 2012).

Durante la fotosíntesis, la enzima responsable de la fijación de CO_2 es la RuBisCO (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), considerada la enzima más abundante en la Tierra. Como carboxilasa, cataliza el primer paso del ciclo de Calvin-Benson, es decir, la incorporación del CO_2 a la molécula de ribulosa 1,5-bisfosfato para generar dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Este fotosintato seguirá reduciéndose hasta dar lugar a azúcares que servirán a la cianobacteria como esqueletos carbonados en sus procesos de biosíntesis. Sin embargo, la RuBisCO presenta mayor afinidad por el O_2 que por el CO_2 de forma que, como oxigenasa, puede catalizar la incorporación de la molécula de O_2 a la ribulosa 1,5-bisfosfato para generar 2-fosfoglicolato. Este compuesto se metaboliza por fotorrespiración empleando grandes cantidades de energía y liberando CO_2 , lo que reduce de forma significativa la eficiencia de la fotosíntesis (Kroth, 2015). La concentración de O_2 en la atmósfera es unas 500 veces superior a la de CO_2 . Además, durante la fotosíntesis las cianobacterias generan O_2 . Este ambiente aeróbico favorecería la actividad oxigenasa de la RubisCO, con el consiguiente derroche de energía. Para solventar este problema e incrementar la eficiencia de la fijación de CO_2 , las cianobacterias han desarrollado distintos sistemas de concentración de CO_2 en las inmediaciones del centro activo de la RubisCO (Burnap *et al.*, 2015). Estos mecanismos, denominados CCM (*CO₂ Concentrating Mechanism*) son tres: transportadores de membrana de HCO_3^- y CO_2 , los cuales llegan a concentrar hasta 1000 veces los niveles de carbono inorgánico en el citosol (Kaplan & Reinhold, 1999; Giordano *et al.*, 2005); anhidrasas

carbónicas que catalizan la interconversión de HCO_3^- y CO_2 , y el carboxisoma, un compartimento celular en el que se confinan la RubisCO y la anhidrasa carbónica (Kerfeld & Melnicki, 2016).

El carbono inorgánico resulta ser limitante en la mayoría de ambientes habitados por las cianobacterias. En estas condiciones, se inducen genes de los sistemas CCM y de las proteínas estructurales de la RubisCO (Price *et al.*, 2008). Así por ejemplo, bajo condiciones de limitación de carbono inorgánico, la proteína CmpR de *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942, un factor de transcripción de la familia de reguladores tipo LysR (LTTR), activa la expresión del operón *cmp*, que codifica las subunidades de un transportador de bicarbonato tipo ABC (Nishimura *et al.*, 2008). En *Synechocystis* PCC 6803, la pérdida de actividad el represor NdhR en condiciones de limitación de carbono determina la inducción de otros sistemas de transporte de CO_2 como los sistemas *ndh* (Wang *et al.*, 2004). Recientemente Picossi *et al.*, han caracterizado la proteína PacR como el regulador global de la asimilación fotosintética de carbono en *Anabaena*. Dependiendo de la disponibilidad de carbono inorgánico, este factor de transcripción tipo LysR regula la expresión de genes que codifican para las subunidades de la RuBiSCO, transportadores Ndh, transportadores de bicarbonato y otras proteínas implicadas en mecanismos CCM. Además, PacR está implicado en la regulación de la expresión de proteínas de los fotosistemas, así como proteínas involucradas en la defensa del aparato fotosintético frente a daños oxidativos (Picossi *et al.*, 2015).

Durante muchos años las cianobacterias se consideraron bacterias autótrofas obligadas, sin embargo, Rippka demostró en 1972 que algunas cianobacterias son capaces de asimilar fuentes reducidas de carbono (Rippka, 1972). Esta capacidad radica en la existencia en estas cianobacterias de transportadores para azúcares como la sacarosa, fructosa o glucosa (Ungerer *et al.*, 2008). Así, además del metabolismo foto-lito-autótrofo de todas las cianobacterias, en la actualidad se conocen numerosos ejemplos de cianobacterias capaces de llevar a cabo un metabolismo foto-químico-heterótrofo, químico-heterótrofo e incluso mixótrofo (Stebegg *et al.*, 2012; Muñoz-Marín *et al.*, 2013).

1.1.3.2.- Asimilación de nitrógeno

Las cianobacterias son capaces de utilizar diversas fuentes combinadas de nitrógeno inorgánico y orgánico tales como el amonio, nitrato, nitrito, urea y algunos aminoácidos y bases nitrogenadas (Flores & Herrero, 1994). Existe una jerarquía a la hora de emplear las distintas fuentes de nitrógeno, de manera que se utilizan preferentemente aquellas fuentes de nitrógeno que impliquen un menor consumo energético. El mecanismo regulatorio mediante

el cual los organismos utilizan una ruta de asimilación en detrimento de otras más costosas energéticamente recibe el nombre de “control por nitrógeno” (Herrero *et al.*, 2001). El control por nitrógeno en cianobacterias está mediado por la proteína NtcA, un regulador transcripcional de la familia CAP que activa o reprime genes implicados en la asimilación de nitrógeno en función de la fuente presente en el medio. La fuente de nitrógeno preferida, o dicho de otro modo, más fácilmente asimilable por las cianobacterias es el amonio. Así, en presencia de concentraciones no limitantes de amonio, el control por nitrógeno de las cianobacterias mantiene reprimidos los sistemas de importación y asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas al amonio. En ausencia de amonio, NtcA promueve la expresión de transportadores y enzimas catabólicas de rutas de asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno. Las cianobacterias cuentan con mecanismos que modulan la actividad de NtcA, como el sistema conformado por la proteína transductora de señales PII y la proteína de unión a PII (PipX). En condiciones de limitación de nitrógeno, los niveles de 2-oxoglutarato (2-OG) aumentan estimulando la acción de NtcA y de PipX. Éste último se une a NtcA estabilizando su conformación activa y actuando por tanto como un coactivador de NtcA (Espinosa *et al.*, 2006). Además PipX cuenta con un sitio de unión para PII. Si PII se une a PipX, lo secuestra impidiendo su unión a NtcA y evitando así su activación. No obstante, PII también une 2-OG, lo que genera un cambio conformacional que impide su unión a PipX, por lo que PipX estaría libre para unirse a NtcA e incrementar su actividad en condiciones de limitación de nitrógeno (Espinosa *et al.*, 2014). De esta forma, el 2-OG actúa a varios niveles incrementando así la respuesta mediada por NtcA.

Cuando en el medio se dan condiciones de ausencia de fuentes de nitrógeno combinadas, muchas cianobacterias son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico gracias a la presencia de la enzima nitrogenasa, un complejo que cataliza la reducción de N_2 hasta amonio en una reacción muy costosa energéticamente (Seefeldt *et al.*, 2009). La nitrogenasa es una enzima altamente sensible al oxígeno y las cianobacterias generan oxígeno durante la fotosíntesis. Las cianobacterias fijadoras de N_2 resuelven esta incompatibilidad mediante dos estrategias: separar temporalmente la fotosíntesis oxigénica y la fijación de N_2 , realizando la fotosíntesis durante las horas de luz y la fijación de N_2 en oscuridad, o separar espacialmente ambos procesos confinando cada uno de ellos en células especializadas (ver apartado 1.1.4: “Diferenciación celular, el heterocisto”).

1.1.3.3.- Biosíntesis de ATP: la F_0F_1 -ATP sintasa

El mantenimiento de la vida en la Tierra depende de un continuo aporte externo de energía ya sea en forma de nutrientes (organismos quimiótrofos) o en forma de luz

(organismos fotótrofos). Estas formas de energía no son directamente utilizables por los seres vivos. Por ello, todos los organismos cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para convertir esa energía en compuestos químicos de alta energía asimilables por la célula. La molécula universal sobre la que pivotan las reacciones metabólicas que demandan energía es el adenosín trifosfato (ATP), por lo que se le considera la moneda universal de transferencia de energía. El ATP posee tres grupos fosfato entre los que se forman enlaces fosfodiéster de alta energía cuya ruptura libera la energía que utilizan las células en numerosas reacciones de su metabolismo. La mayoría del ATP celular se sintetiza mediante la acción del complejo enzimático F_0F_1 ATP-sintasa, presente en todos los seres vivos. Este complejo se encuentra siempre anclado a un sistema de membranas y utiliza el potencial electroquímico generado entre ambos lados de la membrana para acoplar la síntesis de ATP con el bombeo de protones (o Na^+) a su través a favor de gradiente (Von Ballmoos *et al.*, 2009). En el caso de los organismos fotosintéticos, la energía de la luz captada por los ficobilisomas desencadena un trasiego de electrones (y protones) a través de la membrana tilacoidal que genera un gradiente electroquímico que aprovecha la F_0F_1 ATP-sintasa para sintetizar ATP. La ATP sintasa se compone de dos subcomplejos: uno transmembrana (componente F_0) y otro soluble (componente F_1) que sobresale de la membrana hacia el citosol de la cianobacteria. El componente F_0 está formado por tres subunidades con una estequiometría $a_1b_2c_{10-15}$ (Mitome *et al.*, 2004; Pogoryelov *et al.*, 2005), mientras que el componente F_1 está constituido por 5 subunidades con una estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (Yoshida *et al.*, 1979) (ver figura 1.3). En 1982, Gresser *et al.*, propusieron un mecanismo de catálisis rotacional en el que la rotación de la subunidad γ respecto a las subunidades $\alpha_3\beta_3$ provocaba la transición por tres estados catalíticos a través de los cuales ocurría la unión del ADP al P_i para producir ATP (Gresser *et al.*, 1982). Los componentes F_0 y F_1 actuarían como motores opuestos interconectados entre sí por dos tallos, uno central móvil formado por las subunidades γ y ϵ , y uno periférico que implica a las subunidades δ y b_2 que actúan de estabilizador de las subunidades $\alpha_3\beta_3$ cuando el rotor gira en su interior (Figura 1.3). En este modelo, se atribuía un papel catalítico a las subunidades $\alpha_3\beta_3$ mientras que la subunidad γ actuaría como eje central móvil que deforma en su giro a las subunidades $\alpha_3\beta_3$. Este mecanismo no se dio por válido hasta que en 1997 se demostró la rotación del eje γ sobre las subunidades $\alpha_3\beta_3$ empleando actina fluorescente fusionada a la subunidad γ (Noji *et al.*, 1997). Exhaustivos estudios posteriores determinaron de forma precisa el mecanismo de catálisis del complejo. Los protones pasan a favor de gradiente por la subunidad a del componente F_0 . Esto provoca la rotación del anillo c y este movimiento se transmite a la subunidad γ . El movimiento de la subunidad γ induce cambios de conformación en los centros catalíticos de las unidades β de los dímeros $\alpha\beta$, de forma que las unidades β van

pasando por tres estados alternativos en cada ciclo: estado L (libre) en el que se produce la entrada del ADP y P_i , el estado T (tenso) en el que se produce la unión del ADP y P_i para formar ATP y el estado O (*open*, abierto) en el que tiene lugar la liberación del ATP. Los tres dímeros $\alpha\beta$ son asimétricos, cada uno de ellos presenta una conformación distinta en cada estado. Esto es debido a que interaccionan de tal forma que cuando una subunidad β adopta la conformación L, la siguiente adopta la conformación T y la siguiente la conformación O. Así, con cada giro de 360° de la subunidad γ , las tres subunidades β pasan por las tres conformaciones, de forma que en cada ciclo se producen y liberan tres moléculas de ATP.

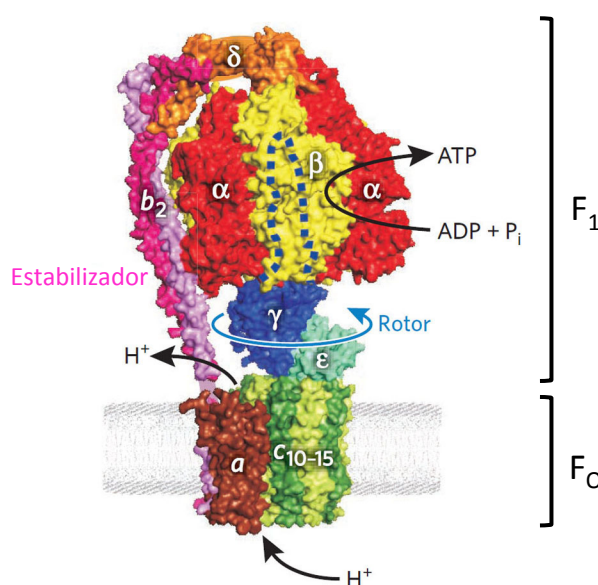


Figura 1.3.- Estructura de la F_0F_1 ATP-sintasa procariota. La estructura de los subcomplejos se ha tomado de la RCSB Protein Data Bank a partir de diferentes organismos. La estructura del anillo c de *Iliyobacter tartaricus* (1CYE), el componente F_1 de *Escherichia coli* (1JNV), la subunidad δ de *E. coli* (2A7U) y la subunidad b_2 de mitocondria bovina (2CLY). Adaptado de Weber J, 2010 (Weber, 2010).

Sin embargo, cuando la fuerza protón motriz no es suficiente para producir ATP, el giro de la subunidad γ puede darse en el sentido opuesto al que experimenta cuando se sintetiza ATP, de manera que se produciría la reacción inversa, es decir, la hidrólisis de ATP. Para evitar el consumo de ATP, se han desarrollado mecanismos regulatorios de la actividad ATPasa del complejo. El mecanismo más común existente en numerosas especies es la inhibición por ADP. La hidrólisis de ATP da lugar a una molécula de ADP que se une fuertemente al sitio activo de la subunidad β bloqueándolo (Dunham & Selman, 1981; Vasilyeva *et al.*, 1982) e induciendo la parada de la rotación (Hirono-Hara *et al.*, 2001). En bacterias y cloroplastos tiene lugar el mecanismo denominado inhibición ϵ . La subunidad ϵ cambia su conformación en función de la concentración de ATP (en bacterias) o del potencial de membrana (en cloroplastos) y ese cambio conformacional impide el giro de la subunidad γ en el sentido de la hidrólisis de ATP (Johnson & McCarty, 2002; Kato *et al.*, 2007). Tanto la inhibición por ADP como la inhibición ϵ

no afectan a la actividad de síntesis de ATP. Por otro lado, La subunidad γ de cloroplastos cuenta con una inserción de 40 aminoácidos en la que se encuentran dos cisteínas. Cuando las condiciones no son las adecuadas para la producción de ATP, por ejemplo durante la noche o cuando el gradiente electroquímico no es favorable, estas dos cisteínas son oxidadas por tiorredoxinas impidiendo el giro de la subunidad γ en el sentido de la hidrólisis de ATP (Hisabori *et al.*, 2013). La F_0F_1 ATP-sintasa de cianobacterias está sujeta a los mecanismos de inhibición ϵ y por ADP (Konno *et al.*, 2006). Sin embargo, la subunidad γ de cianobacterias carece de las dos cisteínas reguladoras, por lo que se piensa que carecen del mecanismo de regulación redox.

1.1.4.- Diferenciación celular: el heterocisto

Las cianobacterias fijadoras de N_2 de las secciones IV y V de Rippka diferencian células especializadas en la fijación de N_2 denominadas heterocistos. En estas células se crea el ambiente idóneo para la catálisis de la nitrogenasa al generarse condiciones microaeróbicas. Esto es debido a que los heterocistos no producen oxígeno ya que el PSII es inactivo en estas células. Además, en los heterocistos existe una alta tasa de respiración y cuentan con una espesa pared celular compuesta de polisacáridos y glicolípidos que impide la difusión del oxígeno (Flores & Herrero, 2010).

El proceso de diferenciación se ha estudiado fundamentalmente en los géneros *Nostoc* y *Anabaena*. Este proceso está orquestado por el regulador transcripcional NtcA (Herrero *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2004) y se requiere de un regulador esencial para la diferenciación, la proteína HetR (Buikema & Haselkorn, 1991; Black *et al.*, 1993). Cuando existe un desbalance en la relación C/N celular, aumentan los niveles de 2-OG y NtcA responde a este aumento iniciando una cascada de activación y represión de genes implicados en la diferenciación del heterocisto. En primer lugar los genes *ntcA* y *hetR* se inducen mutuamente, primero *hetR* y luego *ntcA* (Muro-Pastor *et al.*, 2002), autorregulándose positivamente hasta alcanzar los niveles adecuados para el proceso de diferenciación. La activación del programa génico que conduce a la diferenciación se da exclusivamente en aquellas células que van a diferenciarse y no en todas. Esto es debido a que la célula que se está diferenciando produce un péptido inhibidor de la diferenciación (PatS) que se exporta al periplasma y difunde a las células vecinas impidiendo que comience la diferenciación (Yoon & Golden, 1998; Corrales-Guerrero *et al.*, 2013). En heterocistos maduros PatS no se produce y es la proteína HetN la que ejerce el papel de inhibidor de la diferenciación (Black & Wolk, 1994). Así, a las 24 horas el filamento de la cianobacteria está constituido por heterocistos distribuidos de forma semirregular cada 10-15 células vegetativas.

El programa de expresión génica diferencial (Flaherty *et al.*, 2014; Corrales-Guerrero *et al.*, 2015) entre células vegetativas y heterocistos tiene también consecuencias fisiológicas y estructurales. Desde el punto de vista metabólico, cada tipo celular lleva a cabo procesos distintos. Los heterocistos no tienen capacidad de fijación fotosintética de CO₂ al no expresar los genes del PSII y la RubisCO (Bradley & Carr, 1971; Winkenbach & Wolk, 1973), mientras que en las células vegetativas habrá un déficit de compuestos nitrogenados al no poseer capacidad de fijación de N₂. Por lo tanto, para el correcto mantenimiento del metabolismo del filamento diazotrófico existe un intercambio de compuestos reducidos de carbono desde las células vegetativas hacia los heterocistos y de compuestos nitrogenados desde éstos hacia las células vegetativas (Herrero *et al.*, 2016).

Estructuralmente existen diferencias significativas entre células vegetativas y heterocistos encaminadas principalmente a proteger a la nitrogenasa del efecto tóxico del oxígeno (Flores & Herrero, 2010). Destacan cuatro aspectos estructurales diferenciales: la presencia en el heterocisto de una envuelta celular adicional, la reorganización de las membranas tilacoidales, la formación del “cuello” del heterocisto y la presencia de gránulos de cianoficina en los polos del heterocisto (Figura 1.4). La capa extra presente en el heterocisto se deposita sobre la membrana externa, y está compuesta de dos capas: una interior de glicolípidos y una exterior más gruesa de polisacáridos (Cardemil & Wolk, 1979). La función de esta envuelta sería la de limitar la entrada de gases en el heterocisto (Murry & Wolk, 1989). Mientras que en las células vegetativas las membranas tilacoidales presentan una organización concéntrica y periférica, en los heterocistos las membranas tilacoidales se reorganizan disponiéndose mayoritariamente en zonas próximas a los polos formando las denominadas membranas “*honeycomb*” (Lang & Fay, 1971). En las membranas *honeycomb* existe una alta tasa respiratoria, lo que reduce el oxígeno evitando su efecto inhibitorio sobre la nitrogenasa (Valladares *et al.*, 2007). Otra característica distintiva de los heterocistos es el estrechamiento del citoplasma en los polos, lo que origina el cuello del heterocisto, donde el septo intercelular se hace más estrecho y la capa de glicolípidos y polisacáridos más gruesa (Lang & Fay, 1971). Recientemente se ha planteado la hipótesis de que la pared del heterocisto sería impermeable a los gases, de manera que el O₂ y N₂ entrarían exclusivamente por el septo. Al ser más estrecho entre células vegetativas y heterocistos, la cantidad de O₂ que entraría sería menor. Por último, durante el desarrollo del heterocisto tiene lugar la formación de unas estructuras refráctiles denominadas gránulos polares. Estos gránulos se localizan en los polos del heterocisto y se componen de cianoficina, un polímero de arginina y ácido aspártico que constituye una reserva de nitrógeno en el filamento diazotrófico (Lang *et al.*, 1972).

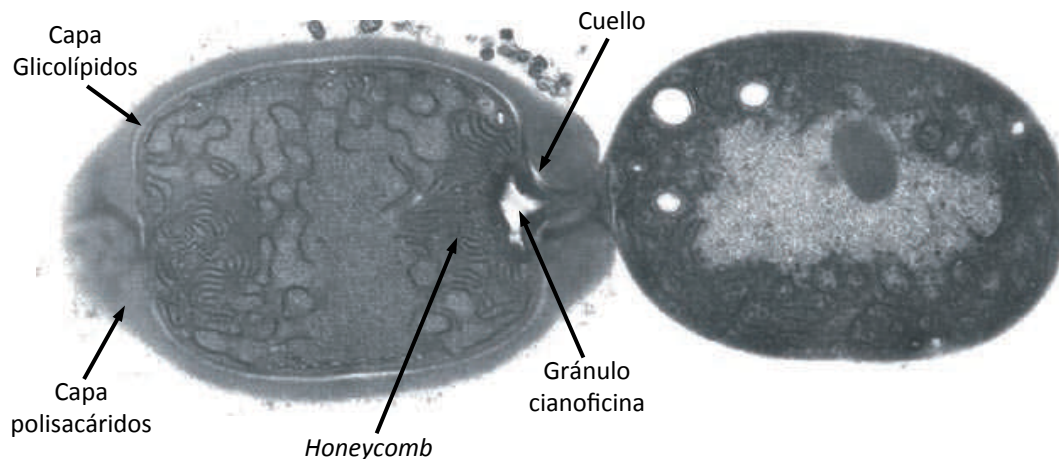


Figura 1.4.- Estructura del heterocisto de *Anabaena*. Micrografía electrónica de transmisión de un heterocisto terminal (izquierda) y una célula vegetativa (derecha) en un filamento de *Anabaena*. Se señalan las principales características estructurales del heterocisto. (Adaptado de Flores & Herrero, 2010).

1.1.5.- Dinámica de la membrana tilacoidal en cianobacterias

Las cianobacterias son organismos con sistemas de membranas claramente diferenciados. Además de la envuelta celular típica de bacterias Gram-negativas, compuesta por la membrana plasmática y la membrana externa separadas por el espacio periplásmico, las cianobacterias cuentan con un sistema adicional de membranas en el que reside la maquinaria de transporte de electrones fotosintética y respiratoria. La presencia de diferentes sistemas de membrana hace de las cianobacterias organismos de una complejidad única entre los procariotas.

1.1.5.1.- Biogénesis de los tilacoides en cianobacterias

A pesar de su indudable importancia, actualmente poco se sabe sobre los mecanismos que subyacen al proceso de síntesis de membrana tilacoidal en cianobacterias. No obstante, en la última década se han hecho grandes avances, prácticamente todos con la cianobacteria modelo *Synechocystis sp.* PCC 6803, que han permitido dilucidar al menos en parte los detalles del proceso. Tres son los escenarios que se han propuesto sobre cómo ocurre la biogénesis de las membranas tilacoidales en cianobacterias (Nickelsen *et al.*, 2011): a) la síntesis de lípidos, proteínas y los pigmentos propios de este tipo de membrana tiene lugar en membranas tilacoidales pre-existentes; b) la síntesis y ensamblaje de estos compuestos ocurre en la membrana plasmática, desde donde son transferidos a la membrana tilacoidal en construcción mediante un mecanismo desconocido; c) la síntesis de los componentes de la membrana tilacoidal ocurre en regiones especializadas denominadas “centros tilacoidales”. Ésta última es la hipótesis más aceptada. En muchas cianobacterias, entre las que se encuentra

Synechocystis sp. PCC 6803, los tilacoides aparecen como sistemas de membrana apilados en paralelo a la membrana plasmática. No obstante, en algunas cianobacterias se ha observado unas estructuras cilíndricas en determinadas regiones donde los tilacoides convergen con la membrana plasmática. Se ha propuesto que estas estructuras corresponden a los centros tilacoidales en los que la síntesis de membrana tilacoidal tendría lugar (Kunkel, 1982; van de Meene *et al.*, 2006).

En 2001, Zak y colaboradores detectaron la presencia de subunidades de ambos fotosistemas en fracciones correspondientes a la membrana plasmática de *Synechocystis* y propusieron que las primeras etapas de la síntesis de los fotosistemas tienen lugar en la membrana plasmática y no en la membrana tilacoidal (Zak *et al.*, 2001). Estudios más recientes apoyan que, al menos la síntesis del PSII, tiene lugar en porciones de membrana distintas a la tilacoidal (Stengel *et al.*, 2012), al identificar al factor de ensamblaje del PSII (PratA) en regiones de membrana especializadas denominadas PDM (*PratA-Defined Membrane*), las cuales se localizan rodeando a los centros tilacoidales. La proteína IM30/VIPP1 (*Vesicle Inducing Protein in Plastids 1*), conservada en cianobacterias y cloroplastos, parece ser un componente importante de los centros tilacoidales (Rütgers & Schroda, 2013) (Figura 1.5). IM30/VIPP1 forma oligómeros de entre 12 y 17 subunidades con una estructura cilíndrica similar a la observada en los centros tilacoidales. Mutantes del gen *vipp1* de *Arabidopsis thaliana* poseen tilacoides aberrantes (Zhang *et al.*, 2012). Lo mismo ocurre en mutantes de *Synechocystis* (Gao & Xu, 2009). Como componente esencial de cualquier membrana biológica, los lípidos han de integrarse en la membrana en construcción. En este proceso podría ser importante el papel de IM30/VIPP1. La composición lipídica de la membrana tilacoidal de cianobacterias difiere ligeramente de la de la membrana plasmática. Ésta se compone básicamente de fosfolípidos, mientras que la membrana tilacoidal está formada mayoritariamente por galactolípidos (Awai, 2016). Se ha propuesto que IM30/VIPP1, que en su forma oligomérica forma una estructura anfipática, une galactolípidos para liberarlos a la membrana tilacoidal en formación (Figura 1.5) (Kroll *et al.*, 2001; Zhang & Sakamoto, 2015). Un aspecto interesante es que en la cianobacteria *Gloeobacter*, que no posee tilacoides, no existe la proteína VIPP1. Todas estas evidencias sugieren un papel importante de VIPP1 en la génesis de los tilacoides. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la mutación del gen *vipp1* en *Synechococcus* sp. PCC 7002 afecta drásticamente a la producción de PSI pero no a la síntesis de tilacoides ni de PSII (Zhang *et al.*, 2014). Otros componentes del aparato fotosintético como la clorofila se sintetizan en *Synechocystis* en el propio centro tilacoidal, donde se insertan en los pre-complejos fotosintéticos en formación (Schottkowski *et al.*, 2009; Bohne *et al.*, 2016).

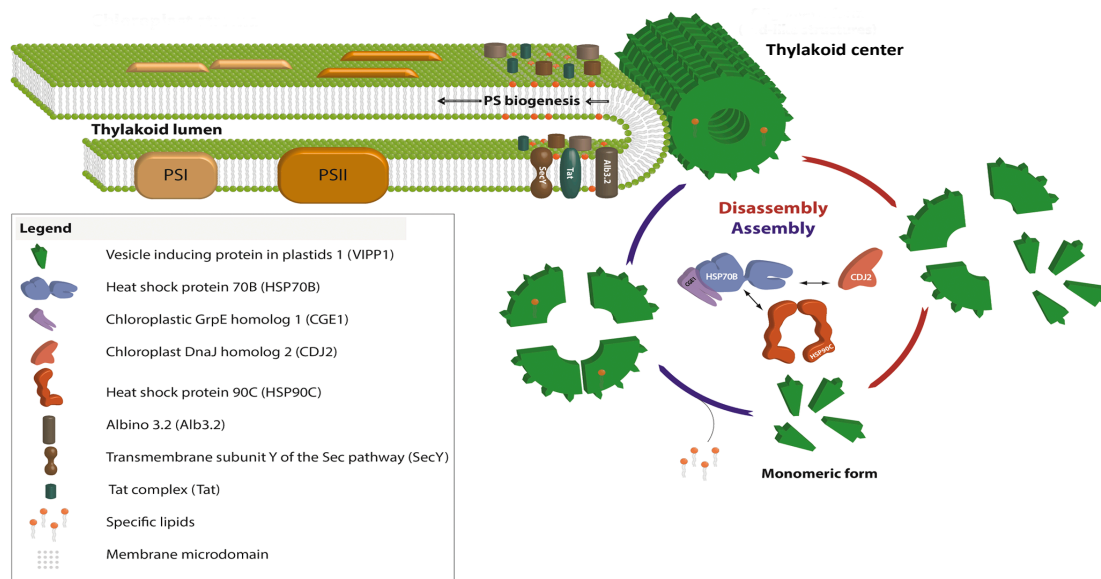


Figura 1.5.- Modelo propuesto para la síntesis de membrana tilacoidal. Modificado de Rütgers & Schroda, 2013.

Otras proteínas de membrana tilacoidal se sintetizan en el citoplasma y son insertadas en la membrana mayoritariamente mediante los sistemas SRP (*Signal Recognition Pathway*). Un pequeño número de ellas pueden ser integradas también mediante los sistemas de transporte Sec o Tat (Aldridge *et al.*, 2009; Frain *et al.*, 2016).

1.1.5.2.- Reorganización de la membrana tilacoidal durante el desarrollo del heterocisto

La disposición de las membranas tilacoidales en el citoplasma es diversa entre las cianobacterias (Hoffmann *et al.*, 2005; Gonzalez-Esquer *et al.*, 2016). En las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos también se observa que la disposición de los tilacoides es distinta en células vegetativas y en heterocistos. En el género *Anabaena* por ejemplo, las membranas tilacoidales se distribuyen formando capas concéntricas que ocupan más o menos regularmente la periferia del citoplasma de las células vegetativas. En el heterocisto en cambio, los tilacoides son más escasos e irregulares en la periferia salvo en las zonas polares próximas a las células vegetativas contiguas donde se empaquetan y se curvan de forma acusada formando una estructura densa a la que se ha dado el nombre de membranas *honeycomb* (figura 1.4) (Lang & Fay, 1971). Dado que los heterocistos no se generan *de novo* sino que se diferencian a partir de una célula vegetativa, la distinta disposición de los tilacoides en los heterocistos obedece a una reorganización de estas membranas durante el proceso de diferenciación. A pesar de que se han descrito varios mutantes de *Anabaena* cuyos heterocistos muestran un fenotipo de carencia de membranas *honeycomb*, se desconocen los mecanismos subyacentes a la dinámica de reorganización de

los tilacoides durante el proceso de diferenciación. Numerosos cambios morfológicos y fisiológicos asociados a la diferenciación están dirigidos a preservar la enzima nitrogenasa del efecto inhibitorio que sobre su actividad ejerce el oxígeno. La reorganización de los tilacoides puede obedecer también a este objetivo, pues las membranas *honeycomb* contienen, entre otras proteínas esenciales para la bioenergética de la célula, oxidasas respiratorias terminales específicas del heterocisto (Cox2 y Cox3) que reducen las trazas de oxígeno provenientes de las células vegetativas contiguas y que entran por el cuello de la célula (Valladares *et al.*, 2007; Magnuson & Cardona, 2016). Un mutante doble *cox2/cox3* de *Anabaena* no forma membranas *honeycomb*, indicando que estas proteínas cumplen una función en la formación de estas membranas (Valladares *et al.*, 2007). Una familia de proteínas implicadas en el mantenimiento de la estructura del filamento de *Anabaena* son las proteínas Fra. La mutación de FraH da lugar a la formación de heterocistos sin membranas *honeycomb* (Merino-Puerto *et al.*, 2011). En heterocistos, FraH se localiza en los polos al igual que las *honeycombs*. Sin embargo, en las células vegetativas se localiza en la periferia de la célula siguiendo un patrón helicoidal que recuerda al de proteínas del citoesqueleto procariota (Jones *et al.*, 2001; Merino-Puerto *et al.*, 2011), lo que podría relacionar la actividad de FraH con el citoesqueleto y la reorganización de membranas en cianobacterias.

1.1.5.3.- Dinámica de los componentes de la membrana tilacoidal

Una característica que define la membrana tilacoidal de cianobacterias es que contiene elementos de la cadena de transporte de electrones fotosintética y respiratoria (Figura 1.6), de forma que estos organismos son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica y la respiración aeróbica en el mismo compartimento. La reorganización de los diferentes complejos proteicos en la membrana tilacoidal en respuesta a los cambios ambientales, en especial la luz, es esencial para regular la dirección del flujo de electrones hacia una ruta u otra optimizando así la eficiencia respiratoria y fotosintética (Liu, 2016).

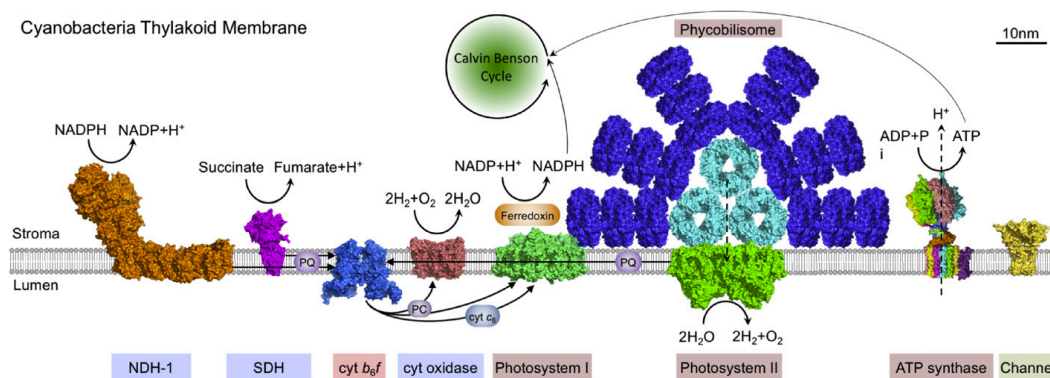


Figura 1.6.- Esquema de los componentes de la cadena de transporte de electrones fotosintética y respiratoria presentes en la membrana tilacoidal de *Synechocystis sp.* PCC 6803. Reproducción de una figura de Liu, 2016.

En la actualidad los conocimientos acerca de la distribución y la dinámica de los elementos presentes en la membrana tilacoidal de cianobacterias es escaso, y se limita casi en su totalidad a los componentes fotosintéticos. En la figura 1.6 puede observarse como la membrana tilacoidal de cianobacterias cuenta con una excepcional abundancia de proteínas, lo cual incrementa la eficiencia de captación de la luz pero limita la difusión de las proteínas. Además de por la densidad molecular, el grado de movilidad de los complejos proteicos en la membrana tilacoidal está determinado por la combinación de una serie de parámetros como la luz, composición lipídica, temperatura y las interacciones proteína-proteína (Nagy *et al.*, 2011; Liberton *et al.*, 2013; Mullineaux, 2014).

Se ha descrito que los ficobilisomas y el PSII se localizan mayoritariamente en los tilacoides situados en la periferia de la célula, mientras que el PSI se distribuye en las membranas de los tilacoides internos (Vermaas *et al.*, 2008), lo que sugiere que los ficobilisomas se asocian preferentemente con el PSII. Sin embargo, en *Synechocystis* se ha aislado un megacomplejo fotosintético compuesto por ficobilisoma-PSII-PSI (Liu *et al.*, 2013) en el que el ficobilisoma canaliza la energía de excitación hacia los centros de reacción de ambos fotosistemas, siendo más lenta la transferencia de energía hacia el PSI. Estudios llevados a cabo en cianobacterias mediante el uso de la técnica FRAP han revelado que los ficobilisomas, que descansan sobre la superficie citoplásmica de la bicapa tilacoidal, son móviles y difunden rápidamente ($5.4 \pm 0.7 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ en *Dactylococcopsis salina* y $3.1 \pm 1 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ en *Synechococcus sp.* PCC 7942); mientras que el PSII, que es un componente integral de membrana, permanece inmóvil durante la escala de tiempo ensayada, lo cual indica que la unión entre el ficobilisoma y el PSII es inestable (Mullineaux *et al.*, 1997; Sarcina *et al.*, 2001). La movilidad de los ficobilisomas es importante para regular el balance entre la transferencia de energía al PSI o al PSII mediante asociación-disociación (Mullineaux *et al.*, 1997; Liu, 2016). A medida que disminuye el tamaño del ficobilisoma, la velocidad de difusión aumenta. Además, la movilidad de los ficobilisomas está fuertemente influenciada por la composición lipídica de la membrana, siendo menor cuanto mayor es el número de insaturaciones en los lípidos (Sarcina *et al.*, 2001). En condiciones de baja intensidad de luz el PSII no experimenta difusión en cianobacterias, probablemente debido a la alta densidad molecular de la membrana tilacoidal. Sin embargo, la exposición a luz roja de alta intensidad provoca que en torno al 50-60% del PSII cambie a un estado dinámico que permite su redistribución en los tilacoides, lo cual parece ser esencial en el ciclo de reparación del PSII frente a la fotooxidación (Sarcina *et al.*, 2006). Muy poca información existe respecto a la movilidad del PSI, el citocromo b_6f y la ATP sintasa en la membrana tilacoidal de cianobacterias. Estudios llevados a cabo en cloroplastos de plantas han demostrado que la movilidad del PSI es mayor que la del

PSII debido a que este último se localiza mayoritariamente en regiones de los tilacoides más empaquetadas en las que la difusión se encuentra más limitada (Kirchhoff *et al.*, 2013).

En cuanto a los componentes de la cadena de transporte de electrones respiratoria, la información existente es más limitada que en el caso de los complejos fotosintéticos. En *Synechococcus sp.* PCC 7942, la exposición a luz de alta intensidad provoca la redistribución (en 30-60 minutos) de la NADPH deshidrogenasa tipo 1 (NDH-1) y de la succinato deshidrogenasa (SDH) hacia zonas del tilacoide con mayor abundancia en componentes fotosintéticos (Liu *et al.*, 2012). Ello sugiere que la cianobacteria regula, según las condiciones lumínicas, la proximidad de ambas cadenas de transporte de electrones para desviar el flujo de electrones hacia la fotosíntesis o la respiración. Este proceso está controlado por el estado de oxidación del *pool* de quinonas (Liu *et al.*, 2012).

Todos estos fenómenos ponen de manifiesto la extraordinaria complejidad de las cianobacterias como organismos procariotas. A lo largo de la evolución han desarrollado mecanismos dinámicos de redistribución de componentes esenciales en su membrana para modificar las cadenas de transporte de electrones en función de las condiciones ambientales.

1.2.- La traducción en procariotas

La comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes en la síntesis de proteínas ha sido uno de los mayores retos en la historia de la Biología Molecular. Desde la década de los 50 ha habido tres grandes descubrimientos que han sido clave para dilucidar los mecanismos de traducción en los seres vivos.

A mediados de los 50, Hoagland y Zamecnik descubrieron que los aminoácidos debían ser activados con ATP para participar en la síntesis proteica (Hoagland, 1955). Las enzimas encargadas de esta activación son las aminoacil-tRNA sintetasas, de las que hablaremos con más detalle en el apartado 1.3. A finales de los 50 tuvo lugar el segundo descubrimiento clave. Paul Zamecnik y colaboradores llevaron a cabo una serie de experimentos que permitieron determinar que la síntesis proteica tenía lugar en los ribosomas (Zamecnik *et al.*, 1958). El tercer hito fue identificar la molécula de tRNA como la encargada de actuar de adaptador entre la secuencia nucleotídica del mRNA y el aminoácido (Berg, 1958; Hoagland *et al.*, 1958) y cuya existencia ya había sido propuesta por Francis Crick en su célebre hipótesis del adaptador (Crick, 1956). Estos tres avances condujeron a la identificación de las principales etapas de la síntesis de proteínas, de los elementos adicionales implicados y, finalmente, al descubrimiento del código genético o reglas de correspondencia entre secuencias nucleotídicas y aminoacídicas (Nirenberg & Matthaei, 1961; Nirenberg *et al.*, 1965).

1.2.1.- El ribosoma procariota

El ribosoma procariota es un complejo ribonucleoproteico de aproximadamente 2.7 MDa constituido por dos subunidades de distinto tamaño. La subunidad pequeña posee un coeficiente de sedimentación de 30 unidades Svedberg (30S) y se compone de un RNA ribosómico 16S y 21 proteínas (denominadas S1-S21). La subunidad grande posee un coeficiente de sedimentación de 50S, y está formada por 36 proteínas (L1-L36) y dos rRNAs, 5S y 23S (Dunkle & Cate, 2013). Cuando ambas subunidades se unen, la partícula resultante posee un coeficiente de sedimentación de 70S. Cuando se descubrió que los ribosomas eran ribonucleoproteínas se pensó que la actividad catalítica recaía sobre el componente proteico. Sin embargo, la publicación de estructuras de alta resolución de las subunidades ribosómicas revelaron que los centros catalíticos estaban compuestos por RNA. En efecto, la molécula con capacidad catalítica en el ribosoma es el rRNA, por lo que el ribosoma es una ribozima. Las proteínas ribosómicas cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura del ribosoma (Cech, 2000; Simonetti *et al.*, 2009).

La subunidad 30S está implicada en la unión al mRNA facilitando la decodificación del mensaje genético al establecerse la interacción codón-anticodón en el denominado “centro de decodificación” (DC). En cambio en la subunidad 50S, que posee el denominado “centro peptidil-transferasa” (PTC), tiene lugar la formación del enlace peptídico. Cuando ambas subunidades se ensamblan, se constituyen los tres sitios de unión del tRNA (Figura 1.7): el sitio “aminoacil” o sitio A, que une el aminoacil-tRNA entrante y que en la subunidad pequeña coincide con el DC; el sitio “peptidil” o sitio P, en el que tiene lugar la formación del enlace peptídico; y el sitio de salida o sitio E (*exit*) que une el tRNA desacilado para ser liberado al citosol (Liu & Fredrick, 2016).

Durante la traducción el ribosoma se desplaza por la molécula de mRNA en dirección 5'-3' leyendo y traduciendo los codones de la secuencia de nucleótidos hasta alcanzar un codón de parada, lo cual señala el desensamblaje de la maquinaria ribosómica para su reciclaje.

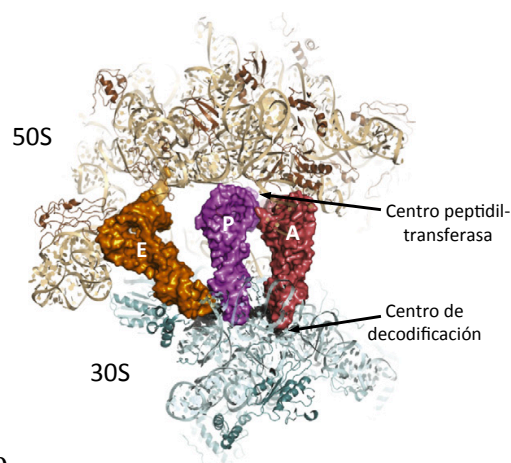


Figura 1.7.- Estructura del ribosoma procariota. La subunidad 30S se representa en color gris (componente RNA y en color cian (componente proteico). La subunidad 50S en color amarillo (RNA) y en marrón (proteínas). Los tres sitios de unión del tRNA se representan en rojo (sitio A), morado (sitio P) y naranja (sitio E). Se señala la localización del centro de decodificación y el centro peptidil-transferasa. Adaptado de Liu & Fredrick, 2016.

1.2.2.- Las etapas de la traducción

En el proceso de traducción se distinguen cuatro fases: inicio, elongación, terminación y reciclaje del ribosoma. En la figura 1.8 se esquematiza todo el proceso en el denominado “ciclo del ribosoma”.

De todas las fases, el inicio de la traducción es el proceso más crítico y, por tanto, el que está sometido a mayor grado de regulación. Esta fase representa el principal factor limitante en la tasa de traducción por lo que supone uno de los principales mecanismos de regulación postranscripcional en procariotas, jugando un papel importante en la estabilidad de muchos mRNAs (Deana & Belasco, 2005). En esta etapa están implicadas las subunidades 30S y 50S del ribosoma, el mRNA molde, un tRNA iniciador especial y tres proteínas denominadas factores de iniciación (IF1-3). En bacterias la ruta de inicio de la traducción no es necesariamente lineal, es decir, que el orden en el que se unen los factores que controlan el proceso es flexible. Típicamente, el proceso comienza con la subunidad 30S unida al factor IF3, el cual evita el ensamblaje prematuro de la subunidad 50S y ayuda al correcto posicionamiento del mRNA sobre la subunidad 30S. A continuación se reclutan el mRNA, que es posicionado sobre el dominio denominado “plataforma” de la subunidad 30S, los factores IF1 e IF2 y el tRNA iniciador fMet-tRNA^{Met} (un tRNA para el codón de metionina inicial cargado con formil-metionina) formando el pre-complejo de iniciación 30S (pre-30SIC) (Myasnikov *et al.*, 2009; Simonetti *et al.*, 2009). En este punto, IF3 ayuda a detectar la región de inicio de la traducción (TIR) del mRNA y la posiciona sobre el sitio P del ribosoma, lo que determina la correcta selección del codón de inicio y el marco abierto de lectura (Hussain *et al.*, 2016). La región TIR se compone de secuencias complementarias a las del extremo 3' del rRNA 16S. La secuencia más común presente en los TIR de muchos mRNAs procariotas es la secuencia Shine-Dalgarno (SD) que es complementaria a la secuencia anti-SD (aSD) conservada en el rRNA 16S. La formación del dúplex entre las secuencias SD-aSD despliega el mRNA de forma que el codón de inicio queda alineado con el DC de la subunidad 30S. A continuación IF2 unido al fMet-tRNA^{fMet} posiciona el tRNA iniciador en el sitio P, y no en el sitio A como ocurre con los tRNAs elongadores, pues IF1 se encuentra ocupando el sitio A. En este punto es necesario mencionar el papel de IF3 como factor que asegura la fidelidad del proceso de traducción. IF3 es capaz de detectar la presencia de un tRNA iniciador incorrecto en el sitio P así como de un codón de inicio erróneo. En esos casos, IF3 induce la disociación del complejo pre-30SIC para que el proceso de iniciación vuelva a empezar. Si todo es correcto, de forma asistida por IF3, se establece la unión codón-anticodón formándose el complejo de iniciación 30S (30SIC) (Gualerzi & Pon, 2015). Ello genera un cambio conformacional que libera a los factores IF1 e IF3, lo cual

permite la interacción de la subunidad 50S con 30SIC. Esta interacción estimula la actividad GTPasa de IF2, que hidroliza GTP permitiendo la unión de la subunidad 50S al 30SIC para formar el complejo de iniciación 70S (70SIC). Finalmente se libera el factor IF2 unido a GDP dando lugar al complejo de iniciación maduro 70S que contiene el mRNA y el fMet-tRNA^{Met} en la posición correcta así como el sitio A libre para la llegada de los aminoacil-tRNAs necesarios en la fase de elongación (Laursen *et al.*, 2005; Simonetti *et al.*, 2009) (Figura 1.8).

Durante la elongación, los aminoacil-tRNAs llegan al sitio A formando un complejo ternario con el factor de elongación Tu (EF-Tu) y GTP. El ribosoma debe seleccionar, de entre la plétora de especies de aminoacil-tRNAs del citosol, aquel adecuado al codón presente en ese momento en el sitio A. La unión del complejo ternario adecuado hace que el aminoacil-tRNA esté el tiempo suficiente en el sitio A como para que ocurra el apareamiento entre las bases del codón y el anticodón (Schmeing & Ramakrishnan, 2009). El mecanismo de corrección de errores del ribosoma solamente verifica si se ha producido el apareamiento codón-anticodón correcto. La identidad de los aminoácidos unidos al tRNA no es revisada en el ribosoma, de ello se encargan las aminoacil-tRNA sintetasas en un proceso que se describirá en el apartado 1.3.4. Si tiene lugar el apareamiento codón-anticodón, EF-Tu hidroliza el GTP y el factor se libera del ribosoma permitiendo el movimiento del aminoacil-tRNA hacia el PTC en un proceso denominado “*accomodation* o acoplamiento”. En el PTC tiene lugar la formación del enlace peptídico, en concreto en un dominio del rRNA 23S con actividad peptidil-transferasa. Allí ocurre el ataque nucleofílico del grupo amino del aminoacil-tRNA del sitio A sobre el carbono implicado en el enlace éster que une el aminoácido al tRNA del sitio P, obteniéndose un peptidil-tRNA en el sitio A y un tRNA desacilado en el sitio P (Voorhees & Ramakrishnan, 2013) (Figura 1.8).

Una vez formado el enlace peptídico, el mRNA y los tRNAs deben moverse respecto al ribosoma en un proceso denominado “translocación”. El ribosoma se desplaza la distancia exacta de un codón hacia el extremo 3' del mRNA y los tRNAs deben translocarse desde los sitios A y P hasta los sitios P y E. Durante este proceso tienen lugar desplazamientos de hasta 50 Å, lo que conlleva grandes cambios conformacionales en el ribosoma (Schmeing & Ramakrishnan, 2009). En la translocación es esencial la participación del factor EF-G unido a GTP, también llamado *translocasa*, cuya estructura mimetiza la de un aminoacil-tRNA unido al EF-Tu, por lo que puede unirse al sitio A del ribosoma. Tras la formación del enlace peptídico, el ribosoma experimenta un giro de 6° que provoca que los tRNAs se muevan espontáneamente pasando a un estado transitorio o híbrido en el que el tRNA desacilado está en un estado E/P (ocupa el sitio E de la subunidad 50S y el sitio P de la subunidad 30S) y el peptidil-tRNA en estado P/A (sitio P de la subunidad 50S y sitio A de la subunidad 30S)

(Voorhees & Ramakrishnan, 2013). Este movimiento libera parcialmente el sitio A, lo que permite la entrada del EF-G unido a GTP. La hidrólisis del GTP provoca un cambio conformacional que permite que el ribosoma vuelva a su posición original desplazando el tRNA desacilado al sitio E (desde donde es liberado al citosol), el peptidil-tRNA al sitio P y dejando libre el sitio A para la llegada de un nuevo aminoacil-tRNA. Este proceso se repite hasta que en el sitio A del ribosoma aparece un codón de parada. Cuando esto ocurre, los factores de liberación RF1 y RF2 contribuyen a la hidrólisis del enlace peptidil-tRNA terminal con la consiguiente liberación del péptido y el tRNA. La estructura de los factores de liberación mimetizan la de un aminoacil-tRNA, por lo que se unen al sitio A cuando aparecen los codones de parada UAG o UAA (para RF1) y UGA o UAA (para RF2). Como estos factores no contienen ningún aminoácido unido, promueven que la actividad peptidil-transferasa transfiera la cadena polipeptídica a una molécula de agua en lugar de a un aminoácido, lo que libera el polipéptido del ribosoma (Rodnina & Wintermeyer, 2016) (Figura 1.8).

Seguidamente tiene lugar el reciclaje de las subunidades del ribosoma para dar comienzo a una nueva ronda de traducción. En este proceso es esencial la participación del factor de reciclaje del ribosoma (RRF) junto con el factor EF-G. La acción conjunta de ambos factores mediante la hidrólisis de GTP induce la separación de la subunidad 50S del complejo 30S, que aún contiene unido el mRNA y el tRNA desacilado. Para la liberación del mRNA y el tRNA es necesaria la unión del factor de iniciación IF3 a la subunidad 30S. La participación en este proceso de IF3 acopla la última etapa de la síntesis de proteínas con la primera, dejando preparada la subunidad 30S para un nuevo ciclo de traducción (Schmeing & Ramakrishnan, 2009; Korostelev, 2011) (Figura 1.8).

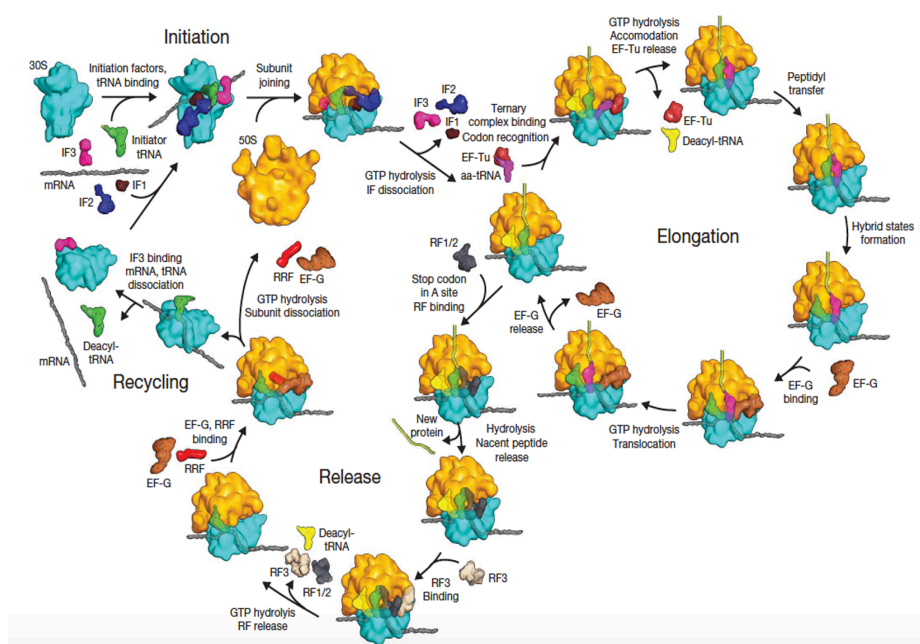


Figura 1.8.- El ciclo del ribosoma.

Resumen esquemático del proceso de síntesis de proteínas en procariotas. Reproducción de una figura de Schmeing & Ramakrishnan, 2009. Detalles en el texto.

1.3.- Las aminoacil-tRNA sintetetas

1.3.1.- Generalidades

La condensación de los tRNAs con los aminoácidos que les corresponden ocurre mediante la reacción de aminoacilación llevada a cabo por las aminoacil-tRNA sintetetas (aaRSs). En esta reacción las aaRSs catalizan la esterificación del tRNA con el aminoácido que le corresponde según su anticodón, dando lugar a un aminoacil-tRNA que servirá posteriormente como sustrato para la síntesis proteica en el ribosoma. Estas enzimas actúan de acuerdo a las reglas del código genético y juegan un papel fundamental en el flujo de información genética en la célula (Woese *et al.*, 2000; Ibba & Söll, 2004). A lo largo de este documento se hará referencia a estas enzimas usando la nomenclatura convencional, según la cual cada aaRS se denomina por el código de tres letras del aminoácido que carga seguido de las letras “RS”. Así, por ejemplo la seril-tRNA sintetasa, que une serina al tRNA de serina (tRNA^{Ser}), se denomina “SerRS”.

La reacción de aminoacilación tiene lugar en dos pasos o semirreacciones consecutivas. La primera semirreacción consiste en la activación del aminoácido con ATP. El aminoácido y el ATP se incorporan al centro activo de la aaRS y se produce un ataque nucleofílico del oxígeno del grupo α -carboxilo del aminoácido al fosfato α del ATP (Figura 1.9A). Como resultado se libera pirofosfato (PP_i) y se forma un aminoacil-adenilato (aa-AMP) que permanece unido a la enzima. La mayoría de aaRSs, salvo GluRS, GlnRS, ArgRS y LysRS de clase I, no requieren la presencia del tRNA para catalizar esta primera semirreacción. En la segunda semirreacción el aminoácido se transfiere al grupo 2'-OH ó 3'-OH de la ribosa del nucleótido terminal del extremo 3' del tRNA, que siempre es una adenina en posición 76 (A76). Como resultado se forma un enlace éster entre el tRNA y el aminoácido, que genera como productos el aminoacil-tRNA (aa-tRNA) y AMP (Figura 1.9B) (Cvetesic & Gruic-Sovulj, 2016).

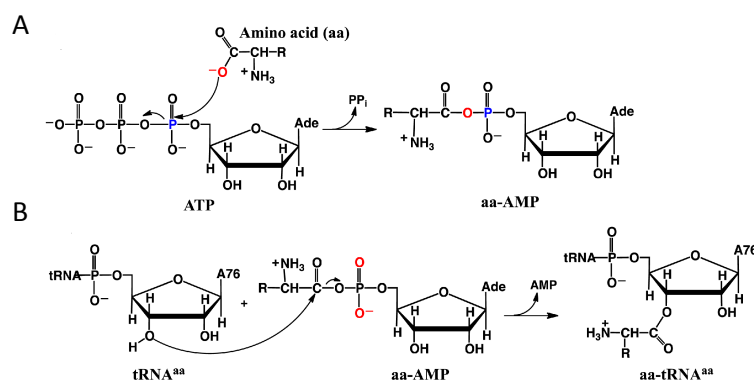


Figura 1.9.- Reacción de aminoacilación. (A) Activación del aminoácido. (B) Transferencia del aminoácido al tRNA. Reproducción de Gherib *et al.*, 2013 (Gherib *et al.*, 2013).

Las proteínas están compuestas en su mayoría por 20 L-aminoácidos, denominados proteínogénicos. En general, las células y orgánulos con capacidad de traducción (mitocondrias y cloroplastos) cuentan con 20 aaRSs, una para cada aminoácido. No obstante, son frecuentes los procariotas u orgánulos que poseen menos de 20 aaRSs ya que muchos carecen de GlnRS y/o AsnRS o, en el caso de algunas arqueas de CysRS,. En estos organismos la síntesis de los aminoacil-tRNAs correspondientes tiene lugar mediante las denominadas “vías indirectas”. De la síntesis de Gln-tRNA^{Gln} y Asn-tRNA^{Asn} se encargan enzimas GluRS y AspRS de especificidad relajada que respectivamente cargan el tRNA^{Gln} y tRNA^{Asn} con Glu y Asp. Posteriormente una amidotransferasa (AdT) convierte el Glu-tRNA^{Gln} y el Asp-tRNA^{Asn} en Gln-tRNA^{Gln} y Asn-tRNA^{Asn} respectivamente utilizando ATP y un donador de grupos amino (Curnow *et al.*, 1996; Ibba *et al.*, 1997a). Algunas arqueas carecen de CysRS de forma que para la síntesis de Cys-tRNA^{Cys} emplean una aaRS no canónica denominada orto-fosfoseril-tRNA sintetasa (SepRS) que carga el tRNA^{Cys} con orto-fosfoserina (Sep) para dar lugar a Sep-tRNA^{Cys}. Este producto es sustrato de la enzima Sep-tRNA:Cys-tRNA sintetasa (SepCysS) que transforma la Sep en Cys (Sauerwald *et al.*, 2005; Labunsky *et al.*, 2014). Por otra parte, algunas bacterias y arqueas metanógenas cuentan con una aaRS no canónica adicional, la pirrolisil-tRNA sintetasa (PylRS). Esta enzima carga pirrolisina (Pyl) al tRNA^{Pyl}, de estructura terciaria poco común, permitiendo incorporar Pyl a las proteínas con codones UAG codificantes (Srinivasan *et al.*, 2002; Polcarpo *et al.*, 2004). En organismos de los tres dominios de la vida existen proteínas que contienen un aminoácido denominado selenocisteína (Sec), que se incorpora durante la traducción en codones UGA. Estos organismos poseen un tRNA específico de Sec pero carecen de una aaRS específica de este aminoácido. Para la síntesis de Sec-tRNA^{Sec}, la SerRS aminoacila el tRNA^{Sec} con serina y, posteriormente, el Ser-tRNA^{Sec} es transformado en Sec-tRNA^{Sec} por la acción de una selenocisteína sintasa (SelA) en bacterias, o por la acción combinada de una O-fosfoseril-tRNA-kinasa (PNKT) y una Sep-tRNA:Sec-tRNA sintetasa (SepSecS) en arqueas y eucariotas (Bullwinkle & Ibba, 2014).

1.3.2.- Clasificación de las aaRSs

Las 23 aaRSs conocidas se agrupan en dos clases en base a criterios de secuencia, estructura y mecanismo de catálisis (Eriani *et al.*, 1990). La clase I se compone de 11 aaRSs, generalmente monoméricas, mientras que a la clase II pertenecen 13 aaRSs que forman dímeros o tetrámeros. Nótese que las aaRSs de ambas clases suman más de 23 enzimas, lo cual se debe a la existencia de dos LysRSs distintas, una de cada clase (Ibba *et al.*, 1997b).

La estructura del dominio catalítico de las aaRSs de ambas clases presenta notables diferencias. El dominio catalítico de las aaRSs de clase I presenta un plegamiento tipo

Rossmann (RF, *Rossmann Fold*) de unión a nucleótidos cerca del extremo N-terminal conformado por 5 láminas β paralelas conectadas por hélices α . En algunas aaRS de clase I, el dominio RF se encuentra dividido en dos por la inserción del denominado *péptido conector 1* (CP1). El dominio catalítico RF de todas las aaRSs de clase I cuenta con dos motivos conservados, HIGH y KMSKS (Schmidt & Schimmel, 1995). Únicamente la glicina del motivo HIGH se encuentra absolutamente conservada y está implicada en la interacción con el ATP al igual que las dos histidinas, que establecen enlaces de hidrógeno con el ATP. La isoleucina ayuda al empaquetamiento hidrofóbico del RF. Las dos lisinas del motivo KMSKS, especialmente la segunda que está más conservada, establecen interacciones con el ATP (Perona & Gruic-Sovulj, 2013). Esta estructura difiere de la del dominio catalítico de las aaRSs de clase II, que está conformado por 7 hojas β antiparalelas flanqueadas por 3 hélices α y que contiene tres motivos de secuencia degenerados denominados motivos 1, 2 y 3 (Cusack *et al.*, 1990). De éstos, únicamente los motivos 2 y 3 están implicados en la catálisis mediante la interacción con el ATP, el aminoácido y el brazo aceptor del tRNA. En cambio, el motivo 1 participa en la oligomerización de la enzima (Perona & Gruic-Sovulj, 2013).

La distinta estructura del dominio catalítico va asociada a diferencias en las interacciones moleculares y los mecanismos de catálisis. Las aaRSs de clase I, salvo la TrpRS y TyrRS, se aproximan al tRNA por el surco menor de su brazo aceptor y unen el aminoácido al grupo 2'OH de la A76 (Yaremchuk *et al.*, 2002). En cambio, las aaRSs de clase II, a excepción de la AlaRS (Naganuma *et al.*, 2009; Sokabe *et al.*, 2009), interaccionan con el surco mayor del brazo aceptor del tRNA y esterifican el aminoácido en el grupo 3'OH de la A76 (salvo la PheRS que transfiere el aminoácido al grupo 2'OH). Por otra parte, existen diferencias en cuanto a la cinética de reacción. La fase limitante en la reacción de aminoacilación catalizada por las aaRSs de clase I es la liberación del aminoacil-tRNA, a excepción de la GluRS e IleRS (Zhang *et al.*, 2006), mientras que para las aaRSs de clase II la etapa limitante es la activación del aminoácido (Guth *et al.*, 2005).

Numerosas evidencias basadas en similitud de secuencia, estructura y mecanismo de catálisis sugieren que las aaRSs de una misma clase tienen un origen evolutivo común, por lo que todas las aaRSs existentes en la actualidad derivarían de dos enzimas ancestrales (Woese *et al.*, 2000; Bullwinkle & Ibba, 2014). Además, análisis filogenéticos de las aaRSs, así como el estudio de características estructurales y catalíticas y de composición de dominios, indican que cada clase puede dividirse a su vez en tres subclases (*a*, *b* y *c*) (Tabla 1.1).

	Subclase	aaRS	Estructura cuaternaria	Edición
Clase I	Ia	MetRS	α_2	Si
		LeuRS	α	Si (Ile, Met)
		IleRS	α	Si (Val, Cys)
		ValRS	α	Si (Thr)
		CysRS	α, α_2	No
		ArgRS	α_2	No
	Ib	LysRS-I	α	No
		GluRS	α	No
		GlnRS	α	No
	Ic	TyrRS	α	No
		TrpRS	α_2	No
Clase II	IIa	SerRS	α_2	Si (Thr, Cys)
		ProRS	α_2	Si (Ala, Gly)
		ThrRS	α_2	Si (Ser)
		GlyRS	$\alpha_2, (\alpha\beta)_2$	No
		HisRS	α_2	No
		AlaRS	α_2	Si (Ser, Cys)
	IIb	LysRS-II	α_2	Si
		AspRS	α_2	No
		AsnRS	α_2	No
	IIc	PheRS	$\alpha_2, (\alpha\beta)_2$	Si (Tyr, Ile)
		SepRS	α_4	No
		PylRS	α_2	No

Tabla 1.1.- Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetetasas. Distribución de las aaRSs en función de la subclase a la que pertenecen. Se indica la estructura cuaternaria de cada enzima así como si presentan función de edición (entre paréntesis los aminoácidos que editan). Basado en la clasificación de Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001a.

Cada una de las subclases derivaría de una proteína ancestral que apareció después del ancestro común de cada clase. Las aaRSs de cada subclase se han ido diversificando a lo largo de la evolución adquiriendo especificidad por distintos aminoácidos y tRNAs. Las enzimas de una misma subclase poseen similitud estructural y tienden a reconocer aminoácidos de similar naturaleza fisicoquímica (Woese *et al.*, 2000; Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001b). Así, por ejemplo las aaRSs de la subclase **Ia** reconocen aminoácidos azufrados (Met y Cys) o alifáticos (Leu, Ile y Val). Las enzimas de la clase **Ib** reconocen aminoácidos cargados como Lys, Glu y su derivado Gln. Los miembros de la clase **Ic** reconocen aminoácidos aromáticos como

Tyr y Trp. Además, esta correlación es extrapolable a las aaRSs de los subgrupos de la clase II, es decir, que las enzimas de la clase IIb también reconocen aminoácidos cargados como Lys, Asp y su derivado Asn y las enzimas de la clase IIc reconocen aminoácidos aromáticos como Phe (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001a; O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003). Esto ha llevado a algunos investigadores a proponer que la simetría que muestran las clases I y II podría tener su origen en la forma en que han evolucionado estas proteínas (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001a).

La llamada “regla de las clases”, que estipula que cada aminoácido es específico de una aaRS de clase I o de clase II pero no de ambas, se rompió cuando se descubrió la existencia de una LysRS de clase I en la arquea *Methanococcus maripaludis* (Ibba *et al.*, 1997b). Este tipo de LysRS también se encuentra en algunas bacterias mientras que las LysRS de clase II es la enzima presente en la mayoría de organismos. Ambos tipos de LysRSs son de origen evolutivo distinto y representan un claro ejemplo de convergencia evolutiva (O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003).

1.3.3.- Origen y evolución de las aaRSs

Las aaRSs son componentes esenciales de la maquinaria de síntesis de proteínas. Por lo tanto son una familia de enzimas que apareció muy pronto en la evolución, incluso antes que el LUCA (*Last Universal Common Ancestor*). Sin embargo, existen grandes interrogantes sobre la implicación de las aaRSs en la transición del hipotético “mundo de RNA” primitivo a la biología actual dominada por proteínas. En la actualidad está ampliamente aceptada la idea de que en los estadios iniciales de la evolución la síntesis de aminoacil-tRNA estuvo catalizada por ribozimas capaces de autoaminoacilarse (Illangasekare & Yarus, 1999; Lee *et al.*, 2000; Kumar & Yarus, 2001). En etapas posteriores habrían surgido las primeras cadenas polipeptídicas por la agregación de aminoácidos unidos a ribozimas capaces de favorecer la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos. Se desconoce cómo ocurrió la transición que dio lugar a la aparición de las proteínas primitivas implicadas en las etapas centrales de la síntesis proteica como las aaRSs. Se especula que inicialmente se habrían seleccionado péptidos que se uniesen a los ribozimas contribuyendo probablemente a su estabilidad. Se ha propuesto que estos complejos proteína-RNA serían el origen de las aaRSs y sus tRNAs correspondientes. El origen de ambas clases de aaRS es altamente especulativo, sin embargo se han propuesto hipótesis basadas en observaciones realizadas en organismos actuales. Como se ha comentado anteriormente, es altamente probable que cada clase de aaRSs derive de una proteína ancestral y se postula que la simetría de las clases I y II podría tener relación con la forma en que estas enzimas han evolucionado. Por ejemplo, se ha propuesto que inicialmente las

enzimas de clase I y II podrían unirse a un mismo RNA por flancos opuestos, lo que surge de la observación de que en general, las aaRSs actuales de clase I y II se unen al tRNA por caras opuestas (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001b). También es sumamente interesante la hipótesis de que las enzimas ancestrales de clase I y II habrían estado codificadas en hebras complementarias de un mismo segmento de DNA (Rodin & Ohno, 1995; Carter & Duax, 2002; Chandrasekaran *et al.*, 2013), lo que habría condicionado su evolución resultando en la simetría observable actualmente. Esta propuesta se basa en análisis de secuencias (Pham *et al.*, 2007) y se ha podido sustanciar experimentalmente diseñando un gen artificial que codifica en cada hebra parte del dominio catalítico de las enzimas de clase I y II (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2015).

Necesariamente, la evolución temprana de las aaRSs va ligada al origen y evolución del código genético (Woese *et al.*, 2000). Dada la universalidad de éste, parece razonable asumir que el LUCA disponía de un código genético totalmente desarrollado, lo que implica a su vez que ya habrían aparecido todas o casi todas las aaRSs. Buena parte de la evolución de estas enzimas habría ocurrido por tanto de forma previa al LUCA. Se ha propuesto que las proteínas ancestrales de cada clase habrían estado constituidas únicamente por su dominio catalítico (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2000). Estas enzimas iniciales habrían tenido una baja especificidad y probablemente habrían podido reconocer varios aminoácidos y tRNAs. La posterior diversificación de las aaRSs habría ocurrido por múltiples eventos de duplicación génica y divergencia, incluyendo la adquisición de nuevos dominios. Ello habría ido acompañado de una progresiva adquisición de especificidad por parte de las nuevas enzimas que finalmente habría acabado por generar las 23 aaRSs conocidas y el código genético actual (Woese *et al.*, 2000).

Respecto a la evolución del resto de la maquinaria de traducción, Xiao y Yu proponen que las primeras aaRSs actuarían permanentemente asociadas a los tRNAs y al ribosoma en el denominado “*translatosoma*”, que representaría la maquinaria de traducción primordial. A medida que el código genético evolucionaba, las aaRSs junto con los tRNAs se habrían separado del ribosoma para evolucionar de forma independiente (Xiao & Yu, 2007; Bullwinkle & Ibba, 2014).

1.3.3.1.- Evolución de las aaRSs por adquisición de dominios

Las aaRSs son enzimas modulares que han evolucionado mediante la adquisición o pérdida de dominios. A este fenómeno se le conoce como *domain shuffling* (Doolittle, 1995; Luque *et al.*, 2008; Di Roberto & Peisajovich, 2014) y constituye un impulso poderoso en la evolución de las proteínas modulares. La transición desde la baja eficiencia y especificidad de

las enzimas ancestrales de cada clase hasta la alta eficiencia y fidelidad de las aaRSs actuales habría ocurrido en gran parte por yuxtaposición de nuevos dominios al dominio catalítico ancestral (Woese *et al.*, 2000). Estos dominios pueden estar relacionados con la función canónica y añaden efectividad a la enzima. Por ejemplo, algunos dominios interaccionan con el tRNA, ampliando la superficie de contacto con éste e incrementando así la afinidad y especificidad (Delarue & Moras, 1993; Perona & Gruic-Sovulj, 2013). Muchas aaRSs cuentan con un dominio de reconocimiento del anticodón y dominios que reconocen otras zonas del tRNA. Otros dominios están implicados en la corrección de errores (Yadavalli & Ibba, 2012). Se pueden distinguir dominios de función relacionada con la función canónica de aminoacilación que se adquirieron temprano en la evolución, por lo que están presentes en una o varias aaRSs y son de distribución universal en la naturaleza, y otros dominios no relacionados con la función canónica, adquiridos más recientemente y cuya distribución está restringida a pocas aaRSs de ciertos *phyla*. El análisis de las aaRSs actuales refleja claramente que el número de dominios adicionales crece a medida que se avanza en la escala evolutiva hacia formas de vida más complejas, siendo muy numerosos en las aaRSs de eucariotas complejos pero no tanto en las de eucariotas inferiores o procariotas (Guo *et al.*, 2010a). En humanos todas las aaRSs salvo la AlaRS cuentan con dominios adicionales, algunos de los cuales están ausentes en la enzima de eucariotas inferiores o bacterias. Muchos de estos dominios aportan una funcionalidad no relacionada con la actividad de aminoacilación, por lo que son en muchos casos responsables de la expansión funcional de las aaRSs (ver apartado 1.3.6).

Entre los numerosos ejemplos de dominios adicionados al cuerpo catalítico de las aaRSs de eucariotas superiores (Figura 1.10) se encuentran algunos que son homólogos a dominios presentes en otras proteínas, como la cremallera de leucinas o el dominio glutatión-S-transferasa (GST).

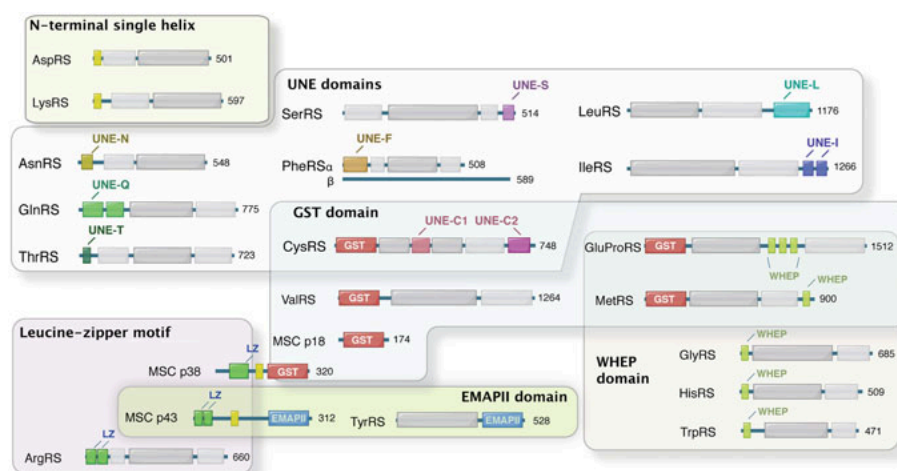


Figura 1.10.- Dominios adicionales identificados en las aaRSs de humanos. Se clasifican las aaRSs en función de los dominios adicionales que poseen. Reproducción de una figura de Guo & Yang, 2013.

En cambio, otros dominios como las hélices N-terminales, el dominio WHEP o el dominio EMAPII son exclusivos de aaRSs (o de factores asociados a aaRSs) y se encuentran en distintas aaRSs. También existen otros dominios denominados “únicos” que se encuentran de manera exclusiva en una sola aaRSs (Guo & Yang, 2013).

Un aspecto interesante es que la adquisición de un dominio suele ser un evento irreversible en la evolución y está asociado en algunos casos a la aparición de una nueva función biológica. Ello ha llevado a plantear la posibilidad de que la adición de nuevos dominios a las aaRSs habría podido desempeñar un papel fundamental en la expansión de la complejidad y sofisticación de los nuevos organismos emergentes (Figura 1.11) (Guo *et al.*, 2010a; Guo *et al.*, 2010b; Guo & Schimmel, 2013).

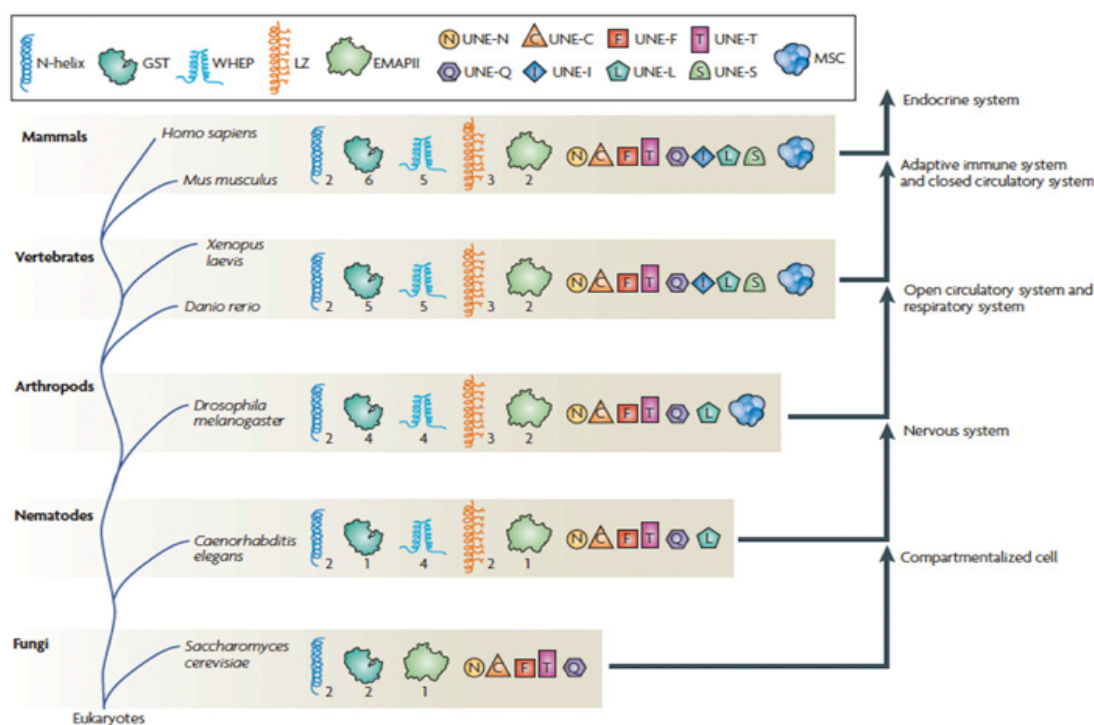


Figura 1.11.- Relación entre la adquisición de dominios en aaRSs de eucariotas y el incremento en la complejidad de los organismos. Presencia de nuevos dominios en aaRSs de eucariotas a medida que se avanza en la escala evolutiva y su relación con la aparición de nuevas funciones biológicas. Para cada clado se utiliza únicamente una especie modelo para la que la secuencia de todas las aaRSs está disponible. En la leyenda superior se indica el código utilizado para hacer referencia a los distintos dominios. GST, dominio glutati6n-S-transferasa; LZ, cremallera de leucinas; UNE-X, dominio único, donde X indica el código de una letra del aminoácido que carga la aaRS que lo contiene; MSC hace referencia al complejo multisintetasa. Los números bajo cada dominio indican la cantidad de aaRSs que contienen ese dominio. Reproducción de una figura de Guo *et al.*, 2010b.

1.3.4.- La función de edición de las aaRSs. Los dominios de edición

La fidelidad con la que la información contenida en el mRNA es traducida al lenguaje de aminoácidos para fabricar proteínas depende de dos procesos esenciales, el reconocimiento codón-anticodón y la síntesis del aminoacil-tRNA. El primero tiene lugar en el ribosoma donde únicamente se comprueba si el apareamiento codón-anticodón es correcto, no si el aminoácido legítimo está unido al tRNA. Este control se efectúa de forma previa y corresponde a las aaRSs. Estas enzimas deben seleccionar específicamente un L-aminoácido entre los 20 presentes en la célula y los tRNAs isoaceptores correspondientes (aquellos que portan anticodones para dicho aminoácido) entre la densa amalgama de moléculas similares del citosol. El reconocimiento de los tRNAs ocurre con una elevada precisión debido al gran tamaño de la molécula y al elevado número de contactos que se establecen entre la aaRS y el tRNA. Sin embargo, los aminoácidos son moléculas relativamente pequeñas, estructuralmente semejantes y algunos con propiedades fisicoquímicas muy similares, por lo que algunas aaRSs pueden seleccionar erróneamente un aminoácido ilegítimo, activarlo y ligarlo al tRNA, produciendo aminoacil-tRNAs en los que el aminoácido no corresponde a la identidad del anticodón. La incorporación de éstos a la síntesis proteica en el ribosoma tendría como consecuencia la introducción de mutaciones en las proteínas. Para mantener el grado de error dentro de los límites tolerados por la célula (un error por cada 10^4 aminoácidos incorporados) (Ling *et al.*, 2009), las aaRSs han evolucionado de una forma muy sofisticada adquiriendo nuevas capacidades catalíticas, asociadas en ocasiones al reclutamiento de nuevos dominios, dedicadas a evitar la liberación de tRNAs aminoacilados incorrectamente. Esta función adicional de corrección se denomina *función de edición*.

No todas las aaRSs son capaces de llevar a cabo la función de edición. Sólo diez enzimas pertenecientes a ambas clases tienen esta capacidad (Tabla 1.1). Los mecanismos de edición se pueden clasificar en dos categorías: mecanismos *pre-transfer*, que actúan antes de que el aminoácido sea transferido al tRNA; y mecanismos *post-transfer*, que lo hacen una vez formado el aminoacil-tRNA. Existen aaRSs dotadas con ambos mecanismos de edición. La actuación de un mecanismo u otro depende de la velocidad con la que el aminoácido se transfiere al extremo aceptor del tRNA, de modo que si la transferencia es lenta la corrección puede ocurrir mediante edición *pre-transfer*, pero si es rápida, la edición ocurrirá más probablemente mediante un mecanismo *post-transfer* (Dulic *et al.*, 2010; Minajigi & Francklyn, 2010).

La edición *pre-transfer* puede tener lugar en las diez aaRSs con capacidad de edición e implica la hidrólisis del aminoacil-adenilato mal-activado (*aa-AMP). Aunque en este tipo de

edición no interviene el tRNA, en algunas aaRSs su unión estimula el mecanismo, lo que se denomina edición *pre-transfer* dependiente de tRNA. Este tipo de edición puede ocurrir mediante la hidrólisis del * aa-AMP en el sitio activo de la enzima o mediante la translocación del * aa-AMP a un sitio de edición distal donde tiene lugar la hidrólisis. Existe también un mecanismo de edición *pre-transfer* independiente de tRNA que tiene lugar mediante dos vías: la liberación selectiva del * aa-AMP al citoplasma, donde el enlace fosfodiéster es hidrolizado espontáneamente; o la hidrólisis enzimática del * aa-AMP en el centro activo o en un sitio de edición distal (Gruic-Sovulj *et al.*, 2005; Gruic-Sovulj *et al.*, 2007; Yadavalli & Ibba, 2012).

Sólo siete de las diez aaRSs con capacidad de edición llevan a cabo edición *post-transfer*, ya que SerRS, MetRS y LysRS-II únicamente editan el * aa-AMP por mecanismos *pre-transfer*. La edición *post-transfer* implica la hidrólisis del enlace éster entre el aminoácido y el tRNA, y ocurre en un sitio activo de la enzima distinto al sitio catalítico sintético. En todas las aaRSs dotadas de actividad de edición *post-transfer*, el sitio activo de edición dista unos 30-40 Å del sitio activo sintético y se encuentra en un dominio distinto al dominio catalítico (Perona & Gruic-Sovulj, 2013). Una vez aminoacilado el tRNA en el sitio activo sintético y antes de la liberación del aa-tRNA, el brazo aceptor de éste se transloca hacia el sitio de edición mientras el resto del tRNA permanece unido a la enzima (Dock-Bregeon *et al.*, 2000; Dock-Bregeon *et al.*, 2004; Palencia *et al.*, 2012) (Figura 1.12). En su movimiento, el extremo aceptor del tRNA se aproxima al sitio de edición, que rechaza los extremos aminoacilados correctamente mediante impedimentos estéricos o químicos y acepta únicamente los aminoacilados incorrectamente, cuyo enlace éster hidroliza liberando separadamente el aminoácido y el tRNA. Además de esta forma de edición en *cis*, la edición *post-transfer* puede ocurrir en *trans*, lo que implica la captura del aminoacil-tRNA mal-acilado (* aa-tRNA) tras ser liberado (Ling *et al.*, 2009; Cvetesic & Gruic-Sovulj, 2016). La edición *post-transfer* en *trans* la llevan a cabo algunas aaRSs de clase II (Ling *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2015) o proteínas independientes que suelen ser homólogas a los dominios de edición de las aaRSs de clase II (Yadavalli & Ibba, 2012; Vargas-Rodriguez & Musier-Forsyth, 2013; Novoa *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). La edición en *trans* generalmente no tiene lugar en las aaRSs de clase I debido a que en estas enzimas la liberación del aa-tRNA suele ser lenta y ello permite que la edición *post-transfer* en *cis* tenga tiempo de actuar (Zhang *et al.*, 2006; Perona & Gruic-Sovulj, 2013).

En el organismo que se usa como modelo en este trabajo, *Anabaena* sp. PCC 7120, se ha descrito un ejemplo de edición en *trans* que implica a una aaRS como factor de edición. *Anabaena* cuenta con dos ThrRSs funcionales, T1 y T2, de las que ésta última es defectiva en edición. T1 y T2 pueden formar heterodímeros en los que T1 aporta la actividad de edición y corrige en *trans* los Ser-tRNA^{Thr} mal-acilados que produce T2 (Rubio *et al.*, 2015).

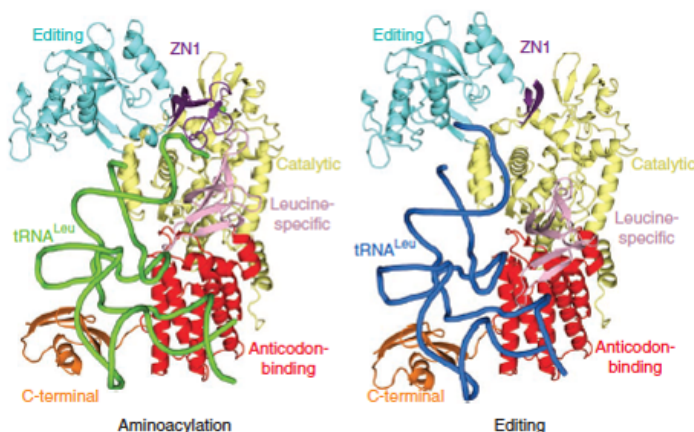


Figura 1.12.- Edición de la LeuRS de *E. coli*. Conformación catalítica (izquierda) y de edición (derecha) de la enzima. En verde se muestra la posición del tRNA en la conformación catalítica. En azul, su posición durante la edición. Se observa con detalle los cambios conformacionales que tienen lugar cuando es necesario editar el tRNA mal-acilado. Puede apreciarse la translocación del brazo aceptor del tRNA. Modificado de Palencia *et al.*, 2012.

1.3.5.- El dominio CAAD

Como se ha mencionado con anterioridad, la presencia de dominios auxiliares en las aaRSs de procariotas es un fenómeno menos frecuente que en eucariotas. No obstante, en las aaRSs de procariotas también se observan fenómenos de *domain shuffling*. Un claro ejemplo se puso de manifiesto con el descubrimiento de un nuevo dominio presente en algunas aaRSs de cianobacterias. Este dominio, al que se ha denominado CAAD (*Cyanobacterial Aminoacyl-tRNA synthetase Appended Domain*), se encontró en 4 aaRSs de 14 especies de cianobacterias (Figura 1.13A). En adelante se hará referencia a estas aaRSs con el superíndice "C" para indicar que contienen el dominio CAAD frente a aquellas que no lo tienen (p.ej aaRS^C vs. aaRS). Resulta muy llamativo que en estas 14 especies encontramos como máximo dos aaRS^Cs, de modo que en distintas especies se encuentran distintas aaRS^Cs. El dominio CAAD no se ha detectado en aaRSs de ningún otro organismo procariota o eucariota, por lo que es exclusivo de aaRSs de cianobacterias. Las 4 aaRSs en las que se ha descrito la presencia del dominio CAAD pertenecen a la clase I y son la GluRS^C, ValRS^C, LeuRS^C e IleRS^C (Luque *et al.*, 2008). En todos los casos el dominio CAAD se inserta en la región C-terminal de la enzima, lejos del dominio catalítico. En GluRS^C, CAAD aparece fusionado al extremo C-terminal a través de una región *linker* mientras que en ValRS^C, IleRS^C y LeuRS^C aparece insertado en una posición intermedia de la región C-terminal (Figura. 1.13A). Es interesante destacar que en ValRS^C de distintas especies, CAAD aparece insertado en dos posiciones alternativas.

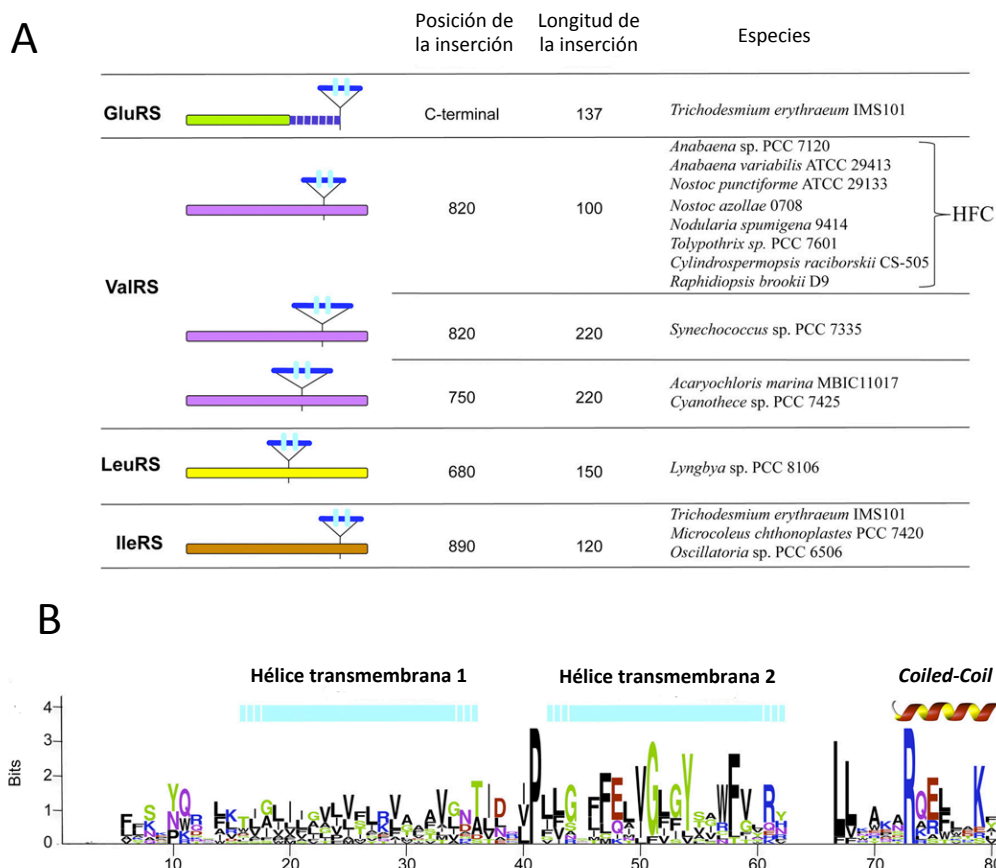


Figura 1.13.- El dominio CAAD de las aaRSs de cianobacterias. (A) Se muestra la posición de la inserción de CAAD en las aaRS que se indican, la longitud del dominio y las especies de cianobacterias en las que está presente dicha aaRS^C. HFC indica cianobacterias formadoras de heterocistos. **(B)** Secuencia consenso del dominio CAAD obtenida con el programa WebLogo. La altura de cada letra es proporcional a la frecuencia del residuo (el más común se muestra arriba). La posición de hélices transmembrana predichas se indica arriba mediante barras celestes con bordes discontinuos (los límites de las hélices varían según el programa de predicción utilizado). Modificado de Olmedo-Verd *et al.*, 2011.

La longitud del dominio CAAD varía entre 100 y 220 aminoácidos. Aunque la secuencia de este dominio en las distintas aaRSs no muestra una alta conservación (el porcentaje de identidades ronda el 25%), existen características estructurales y de secuencia que lo hacen reconocible, como por ejemplo, la existencia invariable de dos hélices transmembrana separadas por 6-8 aminoácidos (de los que el último siempre es una prolina), una α -hélice *coiled-coil* cerca del extremo C-terminal (que podría estar implicada en interacciones proteína-proteína) y una serie de aminoácidos absolutamente conservados (Figura 1.13B) (Olmedo-Verd *et al.*, 2011).

Estudios realizados por Olmedo-Verd *et al.*, mostraron que el dominio CAAD de ValRS^C de *Anabaena* probablemente no está involucrado en la función catalítica de esta proteína, pues la delección del dominio no altera los parámetros cinéticos (K_m para los distintos sustratos y la k_{cat}) de forma significativa. Esto es consistente con el hecho de que el punto de inserción de CAAD se encuentre lejos del dominio catalítico y en la cara opuesta a la que interacciona

con el tRNA (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Todo ello sugiere que en la estructura tridimensional, el dominio CAAD se extruye del cuerpo de la enzima no alterando su actividad catalítica. La presencia de dos hélices transmembrana en el dominio CAAD llevó a analizar la localización subcelular de las aaRSs^C. Olmedo-Verd *et al.*, demostraron que la actividad de carga de tRNA^{Val} y tRNA^{Leu} se encuentra en la fracción de membrana de cianobacterias que portan respectivamente ValRS^C (*Anabaena* sp. PCC 7120, *Tolypothrix* sp. PCC 7601) o LeuRS^C (*Lyngbya* sp. PCC 8106). Dichas actividades se encuentran en cambio en la fracción soluble de cianobacterias cuyas enzimas carecen del dominio CAAD. Ello puso de manifiesto una correlación entre la presencia del dominio CAAD y la localización de la actividad en la fracción de membrana (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). A diferencia de otros procariotas, las cianobacterias tienen dos sistemas de membrana en contacto con el citoplasma, la membrana plasmática y la membrana tilacoidal. Mediante fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP), se demostró que la ValRS^C de *Anabaena* se localiza en la membrana tilacoidal, mientras que ValRS^{ΔC}, una versión mutante de la enzima carente del dominio CAAD, aparecía confinada en la porción soluble del citoplasma. Se demostró que CAAD es necesario y suficiente para determinar la localización de las aaRSs^C en la membrana tilacoidal y que puede dirigir y anclar en estas membranas otras proteínas a las que se fusionó artificialmente (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). El hecho de que los genes que codifican para las aaRSs^C sean de copia única indica que estas enzimas son funcionales *in vivo*. La presencia de aaRSs catalíticamente activas ancladas de forma permanente a un sistema de membranas es un rasgo exclusivo de cianobacterias no observado hasta ahora en ningún otro organismo.

Los análisis de secuencia muestran que el dominio CAAD es homólogo a una familia de proteínas de la membrana tilacoidal de cianobacterias y cloroplastos llamada Curt1 o CURT1, respectivamente (Armbruster *et al.*, 2013; Luque & Ochoa de Alda, 2014). Estas proteínas se insertan en la membrana tilacoidal induciendo curvatura en la misma y se les atribuye un papel fundamental en el mantenimiento de la acusada curvatura de los bordes de los sacos de los grana, donde la concentración de estas proteínas es mayor (Armbruster *et al.*, 2013). Recientemente se ha descrito que la proteína Curt1 de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, está implicada en el mantenimiento de la arquitectura de la membrana tilacoidal, en el ensamblaje del PSII y en la resistencia a estrés osmótico (Heinz *et al.*, 2016). Los cloroplastos y las cianobacterias tienen un origen evolutivo común y una arquitectura relativamente similar, aunque los tilacoides de las cianobacterias no se apilan formando grana. A pesar de ello, CURT1A de *Arabidopsis thaliana* es capaz de complementar parcialmente al mutante *curt1* de *Synechocystis*, lo que indica una conservación parcial de la función (Armbruster *et al.*, 2013).

La estructura secundaria de las proteínas de la familia CURT1 revela la presencia de

dos hélices transmembrana flanqueadas por una hélice anfipática en el extremo N-terminal y una cuarta hélice en el C-terminal. El papel en la curvatura de la membrana de estas proteínas es consistente con la presencia de la hélice anfipática, una característica estructural que en otras muchas proteínas induce curvatura de bicapas lipídicas (Drin & Antonny, 2010). El dominio CAAD también cuenta con dos hélices transmembrana pero, a diferencia de las proteínas de la familia CURT1, no siempre son predecibles hélices anfipáticas en las secuencias CAAD (Luque & Ochoa de Alda, 2014), por lo que no se puede deducir si las aaRSs que contienen el dominio CAAD están implicadas en la curvatura de las membranas tilacoidales.

El hecho de que diferentes aaRSs de distintas especies de cianobacteria cuenten con el dominio CAAD pone de manifiesto que a lo largo de la evolución ha habido varios eventos independientes de adquisición del dominio. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares por los que algunas aaRSs de cianobacterias han reclutado el dominio CAAD, su adquisición recurrente en la evolución sugiere que el anclaje de aaRSs a la membrana tilacoidal aporta alguna ventaja selectiva (Olmedo-Verd *et al.*, 2011).

A pesar de los avances recientes en la caracterización de las aaRSs^C, aún se desconoce en gran medida a qué obedece esta localización subcelular anómala y el motivo de la existencia de distintas aaRSs^C en diferentes especies de cianobacteria.

1.3.6.- Funciones no canónicas de las aaRSs

Las aaRSs son enzimas *housekeeping* esenciales cuya función principal o canónica consiste en sintetizar los sustratos (aminoacil-tRNAs) para la síntesis ribosomal de proteínas. No obstante, en los últimos 30 años numerosos estudios han puesto de manifiesto que las aaRSs son capaces de llevar a cabo funciones no relacionadas con la traducción (Figura 1.14). Muchas de las funciones alternativas o no canónicas que desempeñan las aaRSs no requieren su actividad catalítica de aminoacilación. A las enzimas con estas capacidades se les llama proteínas *moonlighting* o de función múltiple, y a las funciones alternativas se las denomina funciones *moonlighting*.

Además, el espectro de funciones no canónicas de las aaRSs es aún más amplio debido a que los aminoacil-tRNAs sintetizados por éstas no solamente participan en la síntesis de proteínas, sino que sirven como sustrato en una variedad de procesos celulares no relacionados con la traducción.

1.3.6.1.- Funciones alternativas de las aaRSs

A lo largo de la evolución, las aaRSs han experimentado una expansión funcional asociada en muchos casos a la adquisición de nuevos dominios proteicos (Guo *et al.*, 2010b). A continuación se describen algunas funciones *moonlighting* que llevan a cabo las aaRSs (figura 1.14).

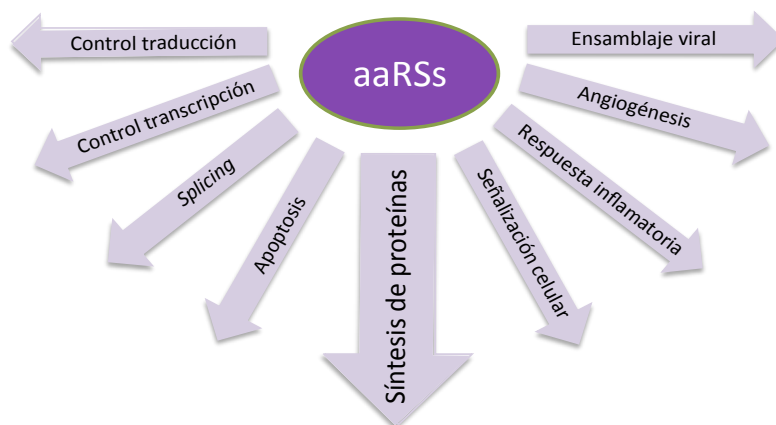


Figura 1.14.- Funciones no canónicas de las aaRSs. Descripción esquemática de las funciones adicionales llevadas a cabo por las aaRSs. Detalles en el texto.

Control de la traducción. Se ha descrito la implicación de distintas aaRSs en el control de la traducción en procariotas y eucariotas mediante mecanismos diversos. Por ejemplo, la ThrRS de *E. coli* regula negativamente la traducción uniéndose a la zona líder 5'-UTR de su propio mRNA cuando la concentración de tRNA^{Thr} es baja. En estas condiciones ThrRS impide la unión de la subunidad 30S del ribosoma para su traducción (Springer *et al.*, 1988; Moine *et al.*, 1990; Torres-Larios *et al.*, 2002). En vertebrados, la enzima bifuncional GluProRS se expresa a partir de un único transcrito. Los dominios WHEP que conectan ambas enzimas aportan a GluProRS la función no canónica de regulación de la traducción. Cuando se fosforila, la GluProRS se separa del complejo multisintetasa (MSC) y se asocia al complejo multiproteico de inhibición de la traducción en respuesta a interferón gamma o GAIT (*IFN-gamma-activated inhibition of translation*) (Sampath *et al.*, 2004). Otro ejemplo del control de la traducción por aaRSs es el de la MetRS de humanos. En todos los organismos la MetRS cataliza la carga del tRNA^{fMet} iniciador. En células humanas, el estrés por radiación UV induce la fosforilación del residuo Ser662 de MetRS que dificulta su unión al tRNA^{fMet}, lo que resulta en una disminución general de la traducción (Kwon *et al.*, 2011). Tanto en levaduras como en humanos se ha descrito la implicación de LeuRS en el control de la traducción mediante la interacción con el complejo TORC1 (*Target of Rapamycin Complex 1*) (Bonfils *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2012). Se ha propuesto que LeuRS funciona como sensor de la concentración de leucina y transductor de

esta señal al complejo TORC1.

Control de la transcripción. Uno de los primeros casos de función *moonlighting* conocidos para una aaRSs fue la implicación de la AlaRS de *E. coli* en la regulación negativa de la expresión de su propio gen. Cuando la concentración de alanina es alta, AlaRS se une a una secuencia palindrómica que flanquea el sitio de inicio de la transcripción de su gen (Putney & Schimmel, 1981; Yao *et al.*, 2013). Por otra parte, en mastocitos humanos la LysRS está implicada en la regulación de la transcripción de genes de respuesta inflamatoria. Mediante su unión al factor de transcripción MITF (Yannay-Cohen *et al.*, 2009). Recientemente se ha descrito que en presencia de azúcares metabolizables por respiración, la MetRS de *Saccharomyces cerevisiae* se transloca al núcleo y regula positivamente la transcripción de genes de la ATP sintasa (Frechin *et al.*, 2014).

Maduración de intrones (splicing). La TyrRS y LeuRS de hongos participan en la maduración de intrones de grupo I en las mitocondrias (Akins & Lambowitz, 1987; Labouesse, 1990). La TyrRS mitocondrial de *Neurospora crassa* promueve la maduración de intrones tipo I de varios genes al unirse a regiones del intrón que mimetizan la estructura de un tRNA (Caprara *et al.*, 1996; Paukstelis *et al.*, 2005). Por otro lado, la LeuRS mitocondrial de levaduras participa en la maduración de los intrones de los genes *cox1* y *cob* (Li *et al.*, 1996).

Señalización celular. En eucariotas superiores son varias las aaRSs implicadas en el control de procesos celulares como la apoptosis, la angiogénesis o la respuesta inmune mediante su participación en rutas de señalización celular. La GlnRS y AsnRS de humanos poseen actividad anti-apoptótica. GlnRS inhibe la apoptosis mediante su unión a ASK1 (*apoptosis-signal regulating kinase 1*), lo cual reprime su actividad kinasa esencial para la respuesta apoptótica (Ko *et al.*, 2001). AsnRS previene la apoptosis en osteoblastos en respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos mediante la activación de la ruta de señalización PI3K/Akt (Park *et al.*, 2009). Algunas aaRSs humanas son inactivas en señalización en su forma intacta, pero en determinadas condiciones se secretan al exterior celular donde se procesan proteolíticamente y sus productos actúan como citoquinas, promoviendo la angiogénesis (TyrRS y ThrRS) o la angiostasis (TrpRS) (Wakasugi & Schimmel, 1999; Otani *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2013).

Recientemente se ha descrito un ejemplo de ganancia de función en la GlyRS de mamíferos relacionado con la neuropatía de *Charcot-Marie-Tooth* (He *et al.*, 2015). Ciertas mutaciones en el gen que codifica para GlyRS generan cambios conformacionales de la

proteína que le permiten interactuar con el receptor de neuropilina (Nrp1), lo que impide la interacción de éste con el factor VEGF.

Ensamblaje viral. Uno de los tRNAs isoaceptores de lisina, el tRNA^{Lys3}, es encapsidado por el virus del VIH para actuar como cebador de la transcriptasa reversa vírica. La LysRS, que une el tRNA^{Lys3}, también es incorporada por el virus y actúa como donadora del tRNA. El dominio adicional conocido como hélice N-terminal de la LysRS es esencial en este proceso ya que este dominio une fuertemente el tRNA (Cen *et al.*, 2004).

1.3.6.2.- Funciones alternativas de los aminoacil-tRNAs

Los aa-tRNAs actúan como sustrato en numerosos procesos biológicos no relacionados con la traducción, los cuales se describen brevemente a continuación.

Durante la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de bacterias se requieren aminoácidos para la formación de los puentes peptídicos de las subunidades de ácido N-acetilmurámico. Los aa-tRNAs actúan en este caso como donadores de L-aminoácidos activos para dicho proceso (Fonvielle *et al.*, 2009). Muchas bacterias cuentan con factores de virulencia MprF que son capaces de aminoacilar los fosfolípidos de membrana usando aa-tRNAs como donadores de aminoácidos. La aminoacilación modifica la permeabilidad y la carga neta de la membrana incrementando la resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos y a algunos antibióticos (Roy *et al.*, 2009; Shepherd & Ibba, 2015). En organismos de los tres dominios de la vida, los aa-tRNAs actúan como donadores de aminoácidos para el marcaje de proteínas en su extremo N-terminal, lo que las etiqueta para su degradación por proteasas Clp en procariotas o por el proteasoma en eucariotas (Raina & Ibba, 2014). En plantas, algas y numerosas bacterias el sustrato del que derivan todos los tetrapirroles (clorofila, hemo, sirohemo, bilinas, vitamina B12) es el Glu-tRNA^{Glu} producido por la GluRS (Schon *et al.*, 1986). Por otro lado, algunos aa-tRNAs son sustrato de la ciclodipeptido sintasa durante la fabricación de ciclodipeptidos. Éstos son péptidos de síntesis no ribosómica que funcionan como metabolitos secundarios en gran variedad de procesos (Raina & Ibba, 2014). Por último, se han descrito algunas rutas de biosíntesis de antibióticos en los que participan aa-tRNAs. Por ejemplo, la valanimicina es un antibiótico derivado de la L-Ser y L-Val cuya síntesis requiere de Ser-tRNA^{Ser} y Val-tRNA^{Val}. Asimismo, la síntesis de pacidamicina requiere de Ala-tRNA^{Ala} (Shepherd & Ibba, 2013).

1.3.7.- Formación de complejos por las aaRSs

La participación de las aaRSs en funciones no canónicas es posible en muchos casos por la asociación con otras proteínas, para lo cual en ocasiones es necesario la presencia de algún dominio adicional. Aunque la formación de complejos por las aaRSs es más común a medida que se avanza en la escala evolutiva, los complejos multiproteicos en los que participan aaRSs se dan en los tres dominios de la vida (Hausmann & Ibba, 2008). A continuación se describen algunos complejos en los que participan aaRSs.

La ProRS es una enzima con cierta propensión a cometer errores en el reconocimiento del aminoácido sustrato, de modo que con cierta frecuencia une alanina y cisteína y genera tRNA^{Pro} mal-acilado con esos aminoácidos. El dominio de edición de ProRS deacila eficazmente el Ala-tRNA^{Pro}, pero no el Cys-tRNA^{Pro}. Para hidrolizar este tRNA mal-acilado, ProRS interacciona de forma estable con la proteína YbaK, la cual es homóloga al dominio de edición de ProRS, y deacila el Cys-tRNA^{Pro} en *trans* (An & Musier-Forsyth, 2004).

Las arqueas, muchas bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos carecen de AsnRS y GlnRS por lo que el Asn-tRNA^{Asn} y el Gln-tRNA^{Gln} se sintetizan mediante una vía indirecta de dos pasos. AspRS y GluRS mal-acilan el tRNA^{Asn} y tRNA^{Gln} con Asp y Glu respectivamente. Posteriormente una amidotransferasa convierte Asp y Glu en Asn y Gln (Ibba *et al.*, 1997a). Aunque en algunos casos la interacción de AspRS y GluRS con la amidotransferasa heteromérica es transitoria (Fischer *et al.*, 2012), en otros organismos forman un complejo estable denominado transamidósoma (Bailly *et al.*, 2007; Rampias *et al.*, 2010; Blaise *et al.*, 2010; Ito & Yokoyama, 2010; Suzuki *et al.*, 2015).

Aunque lo más frecuente en bacterias es la formación de complejos binarios de una aaRS con otra proteína, en arqueas y eucariotas las aaRSs se encuentran complejos de un orden superior constituidos por varias aaRSs asociadas a diversos factores celulares. En la arquea *Methanothermobacter thermoautotrophicum* se da un complejo multisintetasa (MSC) estable formado por LysRS, LeuRS y ProRS en el que LeuRS actúa como núcleo interaccionando por su extremo N-terminal con LysRS y por el C-terminal con ProRS. En contacto con LeuRS la actividad de LysRS y ProRS incrementa en un factor de 3, mientras que la actividad de LeuRS no se ve alterada (Praetorius-Ibba *et al.*, 2007). Además, el factor de elongación EF1A (equivalente al EF-Tu de bacterias) también interacciona con el dominio de edición CP1 de LeuRS, lo cual aumenta la eficiencia catalítica de LeuRS (Hausmann *et al.*, 2007; Havrylenko & Mirande, 2015). La SerRS y ArgRS de *M. thermoautotrophicum* interaccionan de forma estable para incrementar la actividad de SerRS en condiciones extremas de temperatura y salinidad (Godinic-Mikulcic *et al.*, 2011). Además estas dos aaRSs interaccionan con el ribosoma para

recapturar los tRNAs liberados por el ribosoma (Godinic-Mikulcic *et al.*, 2014). En la arquea *Thermococcus kodakarensis* existe un MSC formado por LeuRS, TyrRS y ProRS que a su vez interacciona con el ribosoma. Se ha propuesto que este tipo de complejos incrementaría la eficiencia de traducción mediante la canalización de sustratos y productos al limitar la difusión de éstos en el citoplasma (Raina *et al.*, 2012).

En eucariotas inferiores existen varios ejemplos de MSC. En *Saccharomyces cerevisiae* la GluRS forma un complejo con MetRS y la proteína Arc1p (Simos *et al.*, 1996; Havrylenko & Mirande, 2015). Arc1p es una proteína de unión a tRNA y estimula la actividad catalítica de las dos aaRSs con las que está asociada. En presencia de Arc1p, el MSC se localiza en el citoplasma, pero cuando Arc1p no está presente ambas aaRSs se disocian. GluRS se dirige hacia la mitocondria y MetRS hacia el núcleo donde regula la expresión de ciertos genes como los de la F₀F₁-ATP-sintasa (Frechin *et al.*, 2014). A medida que incrementa la complejidad de los organismos, se van sumando aaRSs y factores asociados a los MSCs (Figura 1.15).

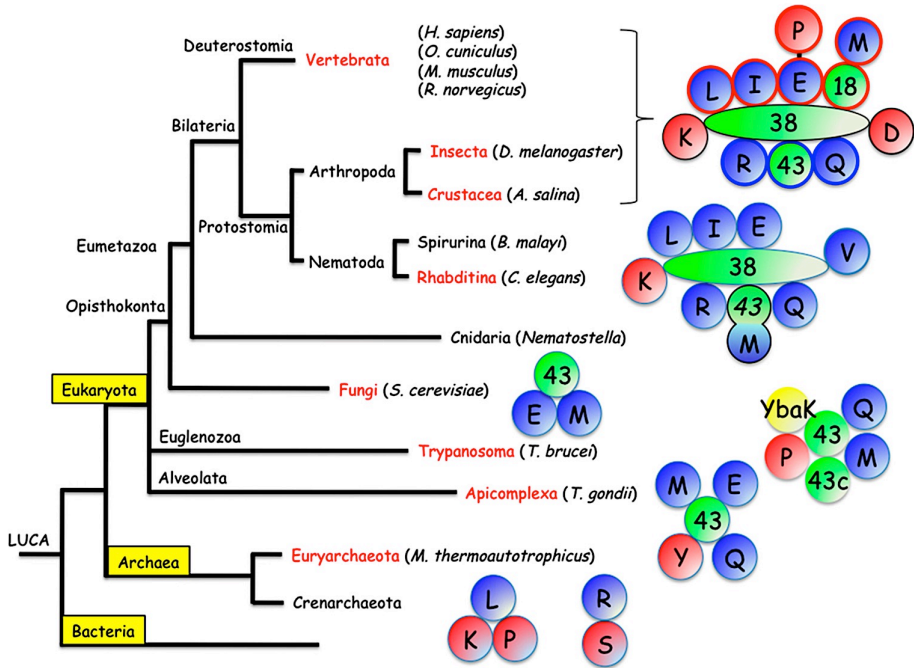


Figura 1.15.- Complejos multisintetasa en los tres dominios de la vida. Se representan los complejos descritos en organismos modelo de cada dominio a medida que se avanza en la escala evolutiva. La identidad de las aaRS se indica según el código de una letra del aminoácido que cargan. Las aaRS de clase I se representan en azul, las de clase II en rojo y los factores auxiliares en verde. Reproducción de una figura de Havrylenko & Mirande, 2015.

El caso más complejo de MSC es el que se encuentra en mamíferos. Se compone de 9 aaRSs tanto de clase I como de clase II (LeuRS, LysRS, IleRS, MetRS, GlnRS, ArgRS, AspRS y GluProRS) y tres factores auxiliares (p18, p38 y p43) (Bandyopadhyay & Deutscher, 1971; Quevillon *et al.*, 1999). El papel de los factores P18 y p38 es principalmente estructural. A p38 se le considera la proteína de ensamblaje del MSC ya que a través de sus dominios GST y

cremallera de leucinas establece contactos estables con los dominios WHEP, GST y cremalleras de leucina de otros componentes del MSC (Figura 1.15). p18 interactúa directamente a través de su dominio GST con el dominio GST de MetRS. La proteína p43 actúa como cofactor en *trans* de interacción con el tRNA para una o varias aaRSs del MSC y su dominio EMAPII le permite actuar como citoquina cuando se separa del MSC (Havrylenko & Mirande, 2015).

Además, se ha demostrado que el MSC interactúa con la maquinaria de traducción (EF1A, ribosomas y polisomas) para incrementar la eficiencia de traducción (Reed *et al.*, 1994; David *et al.*, 2011). El MSC es un elemento clave en la homeostasis celular ya que la organización de numerosas aaRSs en un mismo complejo permite a la célula controlar el equilibrio entre las funciones relacionadas con la traducción de las aaRSs, cuando están asociadas en el MSC, y sus funciones no canónicas, cuando se separan del MSC y se dirigen a otros compartimentos de la célula (o son excretadas) para llevar a cabo funciones *moonlighting*.

1.4.- El RNA de transferencia

1.4.1.- Generalidades

El RNA de transferencia (tRNA) es una molécula de RNA no codificante presente en todos los seres vivos de un tamaño que oscila entre los 73 y 93 nucleótidos. Su función principal consiste en aportar los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas en el ribosoma y asegurar su correcta inserción en la posición que indican los codones del mRNA. Los tRNAs actúan pues como adaptadores entre el lenguaje de nucleótidos de los ácidos nucleicos y el de aminoácidos de las proteínas, jugando por tanto un papel esencial en la expresión del mensaje genético. Además de ser un componente central de la maquinaria de traducción, los tRNAs cumplen diversas funciones no relacionadas con la síntesis de proteínas (Katz *et al.*, 2016) (ver apartado 1.4.3).

En la molécula de tRNA existen numerosas secuencias complementarias entre las que se establecen enlaces de tipo Watson-Crick que dan lugar a regiones de doble cadena conectadas por lazos monocatenarios. De esta forma el tRNA adopta una estructura secundaria cuya conformación se asemeja a una “hoja de trébol” (Figura 1.16A). En su estructura secundaria pueden distinguirse una serie de elementos estructurales comunes a todos los tRNAs. Destacan el brazo D, denominado así por contener la base modificada dehidrouridina; el brazo del anticodón, que cuenta con el triplete de nucleótidos que confiere la identidad al tRNA; el brazo T ψ C, que de forma invariable contiene las bases timina y pseudouridina (ψ) y el brazo aceptor que posee la secuencia CCA en el extremo 3', a cuya adenina terminal se une el aminoácido.

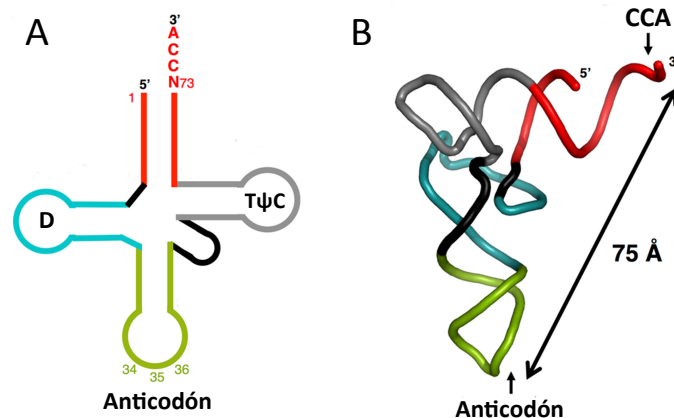


Figura 1.16.- Estructura secundaria y terciaria del tRNA. (A) Representación de la estructura secundaria del tRNA en forma de hoja de trébol. Se representa en azul el brazo D, en verde el brazo del anticodón, en negro el brazo variable, en gris el brazo T ψ C y en rojo el brazo aceptor. (B) Representación tridimensional de la estructura terciaria del tRNA en forma de “L invertida”. El código de colores es el mismo que en (A). Se indica la posición del triplete del anticodón y la secuencia 3'-CCA terminal. Modificado de Tamura, 2015.

Los distintos motivos estructurales del tRNA se pliegan e interaccionan entre sí de tal forma que le hacen adoptar una estructura terciaria de “L invertida” de gran estabilidad por las numerosas interacciones intramoleculares (Figura 1.16B). Esta conformación es consecuencia del apilamiento del brazo aceptor y el brazo T ψ C para formar un bucle denominado “minihélice” (Francklyn & Schimmel, 1989), y del brazo D sobre el brazo del anticodón. Como resultado, el brazo aceptor y el brazo del anticodón se sitúan en extremos opuestos, entre los que existen unos 75 Å de distancia (Tamura, 2015).

1.4.2.- Síntesis y maduración del tRNA en procariotas

El primer paso en la biosíntesis del tRNA es su transcripción, que genera una molécula de RNA afuncional. Para ejercer de forma correcta su función, cada molécula de tRNA es objeto de un proceso de maduración complejo que implica cambios en su estructura y su composición.

1.4.2.1.- Síntesis de los tRNAs

Los genes que dan lugar a los diferentes tRNAs (genes *trn*) están bastante conservados en los tres dominios de la vida. En todos los genomas es común encontrar familias de genes que codifican para los tRNAs que reconocen los diferentes codones de un mismo aminoácido (tRNAs isoaceptores) (Goodenbour & Pan, 2006). En eucariotas, los genes *trn* se transcriben en el nucleolo por la RNA polimerasa III mientras que en procariotas su transcripción la realiza de la única RNA polimerasa existente. En bacterias Gram-negativas, la expresión de los genes *trn* tiene lugar habitualmente a partir de un promotor vegetativo dependiente de σ^{70} de secuencia

similar a la del promotor consenso (Soll & RajBhandary, 1995). En todos los organismos los tRNAs se sintetizan como un precursor más largo (pre-tRNA) que ha de ser procesado para obtener un tRNA funcional (Shepherd & Ibba, 2015).

1.4.2.2.- Procesamiento de los pre-tRNAs

La transcripción de los genes *trn* genera transcritos denominados pre-tRNAs de mayor longitud que los tRNAs maduros al poseer secuencias extra tanto en el extremo 5' (secuencias líder) como 3' (secuencias tráiler). Las células de los tres dominios de la vida poseen endonucleasas y exonucleasas encargadas de procesar los pre-tRNAs (Gegenheimer & Apirion, 1981; Grosjean, 2009). El procesamiento del extremo 5' suele preceder al del extremo 3' y en todos los seres vivos es llevado a cabo por la endonucleasa RNasa P. La única excepción es la arquea *Nanoarchaeum equitans* cuyos pre-tRNAs no cuentan con secuencia líder (Randau & Söll, 2008). La RNasa P es una ribozima con gran versatilidad de sustrato. El componente RNA de la RNasa P reconoce el brazo T ψ C, el brazo aceptor y el extremo 3'-CCA terminal del pre-tRNA y genera un corte endonucleolítico en el extremo 5' que resulta en un grupo 5'-monofosfato (Grosjean, 2009). En procariotas, la RNasa P tiene preferencia por los pre-tRNAs que contienen la secuencia 3'-CCA. No obstante, en cianobacterias, cuyos pre-tRNAs suelen carecer de la secuencia 3'-CCA, la RNasa P procesa eficientemente el extremo 5' (Pascual & Vioque, 1999).

El procesamiento del extremo 3' es más complejo ya que sobre él actúan varias ribonucleasas. Las rutas de procesamiento en 3' de los pre-tRNAs varían dependiendo de la presencia o ausencia de la secuencia 3'-CCA, esencial para la aminoacilación del tRNA. En bacterias normalmente los genes *trn* cifran para la secuencia 3'-CCA. No obstante, en todos los eucariotas y mayoría de arqueas y cianobacterias, los genes *trn* no suelen codificar dicha secuencia (Heinemann *et al.*, 2010; Puerto-Galan & Vioque, 2012), la cual es añadida post-transcripcionalmente por una ATP(CTP):tRNA nucleotidiltransferasa que inserta la secuencia CCA al extremo 3' del pre-tRNA utilizando ATP y CTP como sustrato (Xiong & Steitz, 2004). Si el pre-tRNA contiene la secuencia 3'-CCA, el procesamiento comienza con un evento endonucleolítico aguas abajo de la secuencia 3'-CCA catalizado por las endonucleasas RNasa E o RNasa III (Ray & Apirion, 1981; Apirion & Miczak, 1993). La RNasa E suele actuar sobre precursores policistrónicos de cadena simple y ricos en secuencias AU, mientras que la RNasa III lleva a cabo el procesamiento de precursores monocistrónicos de doble cadena. La actividad endonucleasa sobre el extremo 3' deja residuos extra que deben ser eliminados mediante actividad exonucleolítica. La exoribonucleasa que se encarga de ello es la RNasa D, que elimina todos los residuos hasta llegar a la secuencia CCA, que actúa como antideterminante de la

actividad RNasa D (Cudny & Deutscher, 1980; Shepherd & Ibba, 2015). Si el precursor carece de secuencia 3'-CCA, como ocurre en cianobacterias, el procesamiento del extremo 3' corre a cargo de la RNasa Z, cuya actividad se ve inhibida por la presencia de la secuencia 3'-CCA (Schiffer *et al.*, 2002; Ceballos-Chávez & Vioque, 2005).

1.4.2.3.- Modificación post-transcripcional de los tRNAs

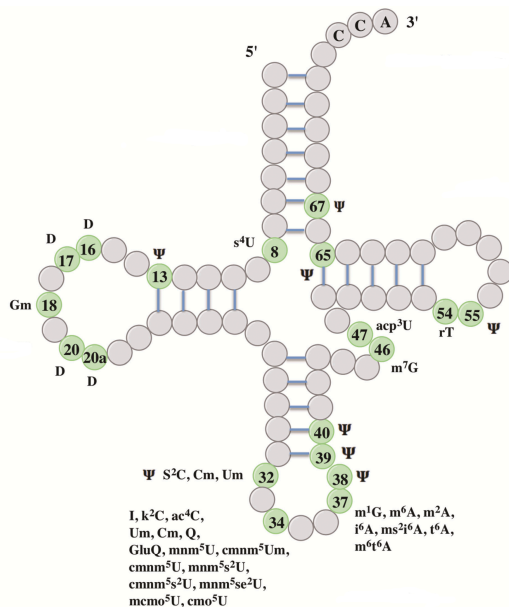


Figura 1.17.- Modificaciones del tRNA. Modificaciones químicas presentes en las bases de los tRNAs de *E. Coli*. Reproducción de una figura de Shepherd & Ibba, 2015.

Una de las características más notables de los tRNAs es el gran número de modificaciones químicas que presentan las bases de la molécula. La célula cuenta con un conjunto muy amplio de enzimas encargadas de llevar a cabo estas modificaciones post-transcripcionalmente. Dichas modificaciones van encaminadas a estabilizar la estructura del tRNA, permitir la adecuada interacción con otras macromoléculas y garantizar la correcta decodificación del mensaje genético contenido en el mRNA (Machnicka *et al.*, 2014). Hasta la fecha, se han identificado más de 100 tipos de modificaciones distintas por lo que no es sorprendente que entre el 1 y el 10% de los

genes de un genoma codifiquen para enzimas implicadas en la modificación post-transcripcional de los tRNAs (El Yacoubi *et al.*, 2012). Las posiciones 34 y 37 del brazo del anticodón (Figura 1.17) presentan modificaciones en casi todos los tRNAs, sin embargo, la identidad de esas modificaciones varía dependiendo de la especie (Grosjean *et al.*, 2010).

Para que los tRNAs sean aminoacilados de forma correcta, deben ser reconocidos por la aaRS adecuada. Para ello, los tRNAs isoaceptores comparten una serie de nucleótidos denominados “determinantes de identidad” que permiten el reconocimiento específico por la aaRS legítima. Muchos de los determinantes de identidad son nucleótidos modificados y se encuentran repartidos por la estructura del tRNA, aunque se concentran en el brazo aceptor y especialmente en el brazo del anticodón (Giegé *et al.*, 1998).

1.4.3.- Funciones no canónicas de los tRNAs

Aunque su principal función es la síntesis de proteínas, se ha descrito que algunos tRNAs intervienen en funciones no relacionadas con la traducción. Los tRNAs pueden

participar en procesos de regulación de la transcripción, de la traducción y de muerte celular que se describen brevemente a continuación (Raina & Ibba, 2014).

Regulación de la transcripción. Los tRNAs no cargados actúan como moléculas efectoras en procesos de regulación de la transcripción en respuesta a estrés nutricional por limitación de aminoácidos. Cuando la concentración de aminoácidos en la célula disminuye, el número de especies de tRNAs descargados aumenta, lo cual es percibido e interpretado por la célula como un síntoma de estrés nutricional. Ante esta situación, las bacterias han adoptado varias estrategias para adaptarse a las condiciones de limitación de aminoácidos. El fenómeno que mejor se conoce es la llamada *respuesta estricta* (*stringent response*) de bacterias. Dicho fenómeno está mediado por la alarmona (p)ppGpp (Haseltine & Block, 1973). En *E. coli*, esta alarmona es producida por la proteína RelA, que percibe la presencia de un tRNA descargado en el sitio A del ribosoma, lo que la activa para producir (p)ppGpp (Agirrezabala *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2016). La acumulación de (p)ppGpp afecta a los procesos que consumen gran cantidad de recursos como la replicación, transcripción y traducción (Traxler *et al.*, 2008). El (p)ppGpp se une a la RNA polimerasa actuando como efector alostérico que, por un lado, inhibe la expresión de genes que codifican para elementos de la maquinaria de traducción (rRNAs y tRNAs) y por otro incrementa la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos (Ross *et al.*, 2013).

Otro mecanismo por el que las bacterias regulan la expresión génica a través de tRNAs descargados es el “sistema de control *T box*” mediante atenuación de la transcripción (Henkin & Yanofsky, 2002; Green *et al.*, 2010). La región 5'-UTR de los genes regulados por este sistema, principalmente genes relacionados con la síntesis de aminoácidos y genes de aaRSs, contienen secuencias ricas en G+C y poli-U que forman elementos estructurales que dan lugar a terminadores de la transcripción prematuros. En condiciones de escasez de aminoácidos, la unión específica de algunos tRNAs descargados a las secuencias reguladoras impide la formación del terminador, lo que permite la transcripción del mRNA.

Regulación de la traducción. En bacterias, la región líder de algunos mRNAs poseen secuencias anti-Shine-Dalgarno (anti-SD) que se unen a la secuencia SD secuestrándola e impidiendo la unión de la subunidad 30S del ribosoma. Algunos tRNAs son capaces de unirse a la secuencia anti-SD evitando su unión a la secuencia SD y permitiendo así la traducción del mRNA. Los genes cuya traducción está sometida a este tipo de regulación normalmente codifican para enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos (Green *et al.*, 2010). En eucariotas, en condiciones de limitación de aminoácidos, ciertos tRNAs descargados pueden

unirse y activar la quinasa GCN2p, la cual fosforila e inhibe al factor de iniciación de la traducción eIF2, reduciendo así la tasa global de síntesis de proteínas (Dong *et al.*, 2000; Raina & Ibbá, 2014).

Muerte celular. La ruta intrínseca (o ruta mitocondrial) de apoptosis se inicia cuando un daño celular induce la permeabilización de la membrana mitocondrial, liberándose citocromo *c* al citoplasma. El citocromo *c* se une al factor APAF-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) que junto con proteínas caspasas forman el apoptosoma, que conduce a la respuesta apoptótica. Los tRNAs descargados pueden unirse al citocromo *c*, impidiendo su unión a APAF-1 y evitando así la formación del apoptosoma. Por lo tanto, los tRNAs juegan un papel antiapoptótico en condiciones de estrés nutricional por limitación de aminoácidos (Mei *et al.*, 2010).

1.4.4.- Organización genómica de los genes de tRNA

Los genes *trn* pueden encontrarse dispersos en el genoma transcribiéndose de forma independiente. No obstante con cierta frecuencia los genes que codifican tRNAs se concentran en regiones genómicas más o menos grandes constituyendo agrupamientos de genes *trn*. Este tipo de agrupamientos se ha descrito tanto en eucariotas como en procariotas. En células eucariotas los agrupamientos de genes *trn* se han identificado mayoritariamente en el genoma mitocondrial (Jung *et al.*, 2010; Smith, 2015). En las amebas del género *Entamoeba* los genes *trn* se organizan en agrupamientos en tándem que llegan a ocupar el 10% del genoma (Tawari *et al.*, 2008). En procariotas el número de especies que contienen agrupamientos *trn* es amplio. Un exhaustivo estudio reciente, en el que se define como agrupamiento *trn* aquel que contiene al menos 20 genes *trn* con una densidad mínima de 2 genes por Kb, ha descrito la presencia de este tipo de agrupamientos en los genomas de 348 bacterias y una arquea, lo que supone un 13% del total de organismos de genoma secuenciado (Tran *et al.*, 2015). Salvo 6 organismos que portan agrupamientos de genes de tRNA en plásmidos, en el resto de los casos los agrupamientos son de localización cromosómica. La mayoría de las especies (322 organismos de un total de 348) en las que se ha detectado estos agrupamientos pertenecen al *phylum* Firmicutes de bacterias Gram-positivas. También se han observado en algunas especies de cianobacterias, γ -proteobacterias y actinobacterias (Figura 1.18) (Tran *et al.*, 2015). La presencia de estos agrupamientos en organismos poco relacionados filogenéticamente sugiere que se han transferido horizontalmente a lo largo de la evolución.

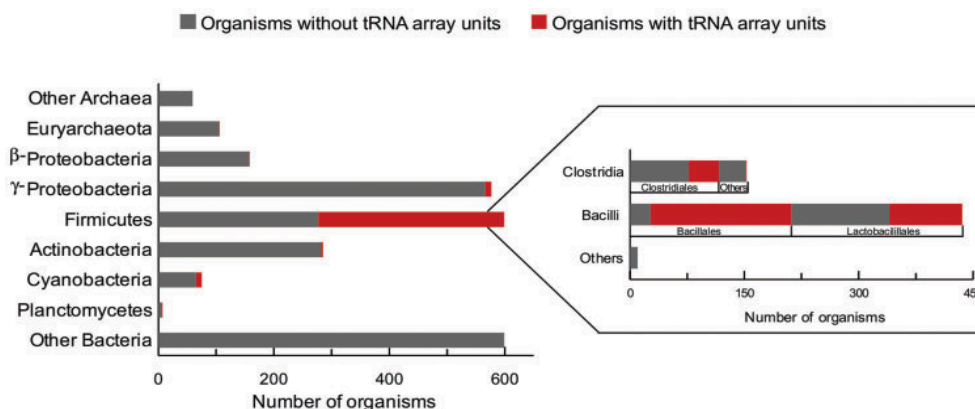


Figura 1.18.- Distribución de agrupamientos *trn* en arqueas y bacterias. Reproducción de una figura de Tran *et al.*, 2015.

Son pocas las especies de bacterias Gram-negativas con agrupamientos *trn*. No obstante, este tipo de agrupamientos se ha descrito en el genoma de 4 especies de cianobacterias: *Oscillatoria sp.* PCC 6506, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Acaryochloris marina* MB1C11017 y *Anabaena sp.* PCC 7120, siendo de localización plasmídica en ésta última (Puerto-Galan & Vioque, 2012). Los agrupamientos de estas cuatro especies están claramente relacionados ya que poseen prácticamente el mismo número de genes *trn* dispuestos en el mismo orden, lo que sugiere un origen común. En general, en cianobacterias el número de genes *trn* oscila entre 37 y 45 los cuales suelen encontrarse dispersos en el genoma transcribiéndose individualmente. Una excepción son los genes *trnY-trnT* que en todas las cianobacterias, salvo *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, aparecen ligados y se transcriben de forma conjunta como un único precursor dimérico (Tous *et al.*, 2001). En el caso de *Anabaena sp.* PCC 7120, existen 48 genes *trn* distribuidos de forma dispersa en el cromosoma, los cuales son suficientes para descodificar todos los codones del código genético. Además, *Anabaena* cuenta en su plásmido delta con un agrupamiento de 26 genes *trn* (de los que 5 podrían ser pseudogenes) en una región de 2.2 Kb (Figura 1.19). Puerto-Galán y Vioque demostraron que los genes del agrupamiento se expresan como un operón (de ahí que en adelante se haga referencia a él como operón *trn*), generando un único transcrito que rápidamente es procesado por la RNasa P y RNasa Z para dar lugar a tRNAs individuales (Puerto-Galan & Vioque, 2012). Además, mediante ensayos de aminoacilación *in vivo*, demostraron que al menos 15 tRNAs del operón se aminoacilan en condiciones estándar de cultivo, lo cual indica que en estas condiciones los tRNAs son procesados, madurados de forma correcta y son plenamente funcionales. Un aspecto interesante es que de los 48 genes *trn* del cromosoma de *Anabaena*, únicamente los genes *trnM_i* (tRNA iniciador) y *trnN-GUU* codifican para la secuencia 3'-CCA. Sin embargo, 8 de los 26 genes *trn* del operón de *Anabaena* cifran

para la secuencia 3'-CCA (representados en azul en la figura 1.19), lo cual es muy inusual en cianobacterias. El hecho de que algunos de los tRNAs que poseen esta secuencia se aminoacilen indica que han sido procesados previamente. Sin embargo, la inhibición de la RNasa Z por la secuencia CCA en 3' implica que este tipo de tRNAs deben ser procesados por otras ribonucleasas aún no identificadas (Ceballos-Chávez & Vioque, 2005; Puerto-Galan & Vioque, 2012).

Los tRNAs del operón del plásmido delta se expresan a un nivel bajísimo. Puerto-Galán y Vioque estimaron que el nivel de expresión podría ser órdenes de magnitud inferior al de los genes de tRNAs del cromosoma. Por otra parte, los tRNAs codificados en el cromosoma son suficientes para traducir los 61 codones del código genético. Todos los tRNAs codificados en el operón salvo el tRNA^{Gln-CUG} y el tRNA^{Glu-CUC} portan anticodones redundantes con los tRNAs del cromosoma. Sin embargo, los tRNAs cromosómicos tRNA^{Gln-UUG} y tRNA^{Glu-UUC} poseen la base U₃₄ modificada, lo cual les permite descodificar los codones de glutamina CAA y CAG y los de glutamato GAA y GAG respectivamente (Agris *et al.*, 2007). Por tanto, los tRNAs del operón del plásmido delta son aparentemente innecesarios para la síntesis de proteínas. Ello es consistente con que un mutante carente de dicho agrupamiento no muestre ningún fenotipo (Puerto-Galan & Vioque, 2012). Sin embargo, la conservación de agrupamientos similares de genes de tRNAs en distintas cianobacterias y su conservación sugieren que éstos podrían tener algún papel que podría no estar relacionado con la traducción, lo que sería interesante de investigar.

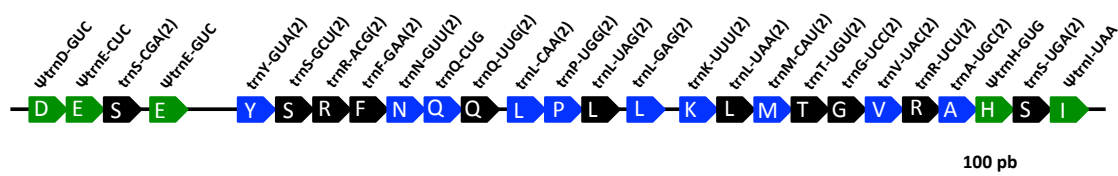


Figura 1.19.- Operón *trn* del plásmido delta de *Anabaena*. Representación esquemática de la organización de los genes *trn* presentes en la agrupación. En verde se representan los posibles pseudo-tRNAs, en negro los genes que no contienen la secuencia CCA y en azul aquellos que codifican para la secuencia CCA. La letra hace referencia al aminoácido para el que codifica cada tRNA. Arriba se indica el anticodón de cada uno de los tRNAs.

OBJETIVOS

1. Determinar la localización subcelular de las aminoacil-tRNA sintetasas de *Anabaena sp.* PCC 7120.
2. Dilucidar el mecanismo molecular que gobierna la relocalización de ValRS^C durante el desarrollo del heterocisto de *Anabaena sp.* PCC 7120.
3. Investigar la función del agrupamiento de genes de tRNAs del plásmido delta de *Anabaena sp.* PCC 7120.

Algunos de los resultados que se presentan en este trabajo de tesis han sido publicados en los artículos que se citan a continuación. Estos artículos pueden consultarse en el Apartado 8.

- **Santamaría-Gómez J**, Ochoa de Alda JA, Olmedo-Verd E, Bru-Martínez R and Luque I. *Sub-Cellular localization and complex formation by aminoacyl-tRNA synthetases in cyanobacteria: Evidence for interaction of membrane-anchored ValRS with ATP synthase.* Frontiers in Microbiology, 2016; 7:857.
- Olmedo-Verd E, **Santamaría-Gómez J**, Ochoa de Alda JA, Ribas de Pouplana L and Luque I. *Membrane anchoring of aminoacyl-tRNA synthetases by convergent acquisition of a novel protein domain.* Journal of Biological Chemistry, 2011; 286:41057-68.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Organismos y condiciones de cultivo

2.1.1.-Cianobacterias

2.1.1.1.-Estirpes de cianobacterias utilizadas

El organismo objeto de estudio en este trabajo ha sido la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120, también llamada *Nostoc* sp. PCC 7120. En la Tabla 2.1 se resume las estirpes mutantes de *Anabaena* empleadas en este trabajo, algunas de las cuales han sido generadas durante esta tesis mientras que otras pertenecen a la colección del laboratorio.

Estirpe	Descripción	Resistencia	Origen
SR10	Estirpe obtenida por recombinación simple en la que se interrumpe el alelo silvestre de <i>valS</i> por integración de un alelo mutante de <i>valS</i> que carece de dominio CAAD.	Nm	Este trabajo
DR10	Estirpe obtenida por recombinación doble en la que se sustituye el alelo silvestre de <i>valS</i> por un alelo mutante de <i>valS</i> que carece de dominio CAAD.	Ninguna	Este trabajo
7120E1	Estirpe que expresa la fusión GFP::CAAD bajo el control del promotor de la <i>cassette</i> C.K3 que confiere resistencia a neomicina.	Nm	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2011)
7120E2	Estirpe que expresa la proteína GFP bajo el control del promotor de la <i>cassette</i> C.K3 que confiere resistencia a neomicina.	Nm	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2011)
7120E5	Estirpe que expresa la fusión ValRS::6His bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2011)
7120E6	Estirpe que expresa la fusión ValRSΔCAAD::6His bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2011)
7120E7	Estirpe que expresa la fusión ValRS::GFP bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2011)
7120E8	Estirpe que expresa la fusión ValRSΔCAAD::GFP bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2011)
JS35	Estirpe que expresa la fusión AtpA::GFP bajo el control del promotor de la <i>cassette</i> C.K3 que confiere resistencia a neomicina.	Nm	Este trabajo
JS52	Estirpe que expresa la fusión GFP::AspRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo

JS53	Estirpe que expresa la fusión GFP::MetRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS55	Estirpe que expresa la fusión GFP::GluRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS57	Estirpe que expresa la fusión GFP::PheRSα bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS58	Estirpe que expresa la fusión GFP::CysRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS59	Estirpe que expresa la fusión GFP::IleRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS60	Estirpe que expresa la fusión GFP::LeuRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS61	Estirpe que expresa la fusión GFP::TrpRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS62	Estirpe que expresa la fusión GFP::TyrRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS63	Estirpe que expresa la fusión GFP::HisRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS64	Estirpe que expresa la fusión GFP::ThrRS1 bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS65	Estirpe que expresa la fusión GFP::ProRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS66	Estirpe que expresa la fusión GFP::SerRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS67	Estirpe que expresa la proteína GFP bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS68	Estirpe que expresa la fusión GFP::ThrRS2 bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS69	Estirpe que expresa la fusión GFP::AsnRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS70	Estirpe que expresa la fusión GFP::LysRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS71	Estirpe que expresa la fusión GFP::AlaRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS72	Estirpe que expresa la fusión GFP::GlyRSα bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS74	Estirpe que expresa la fusión GFP::ValRS bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>).	Sm, Sp	Este trabajo
JS83	Estirpe que expresa, bajo el control del promotor inducible por cobre de la plastocianina (<i>PpetE</i>), la LeuRS de <i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106 fusionada al extremo C-terminal de la proteína	Sm, Sp	Este trabajo

	GFP.		
JS122	Estirpe que expresa la proteína de fusión GFP::CAAD bajo el control del promotor específico de heterocisto <i>PpatS</i> .	Sm, Sp	Este trabajo
JS123	Estirpe que expresa la proteína de fusión GFP::CAAD bajo el control del promotor específico de heterocisto <i>PhetN</i> .	Sm, Sp	Este trabajo
JS124	Estirpe que expresa la proteína de fusión GFP::CAAD bajo el control del promotor específico de células vegetativas <i>PsusA</i>	Sm, Sp	Este trabajo
JS232	Estirpe que expresa la proteína GFP bajo el control del promotor específico de heterocisto <i>PpatS</i> .	Sm, Sp	Este trabajo
JS133	Estirpe que expresa la proteína GFP bajo el control del promotor específico de heterocisto <i>PhetN</i> .	Sm, Sp	Este trabajo
JS134	Estirpe que expresa la proteína GFP bajo el control del promotor específico de células vegetativas <i>PsusA</i> .	Sm, Sp	Este trabajo
MN38	Estirpe en la que la ORF del gen <i>all2473</i> (<i>zur</i>) ha sido inactivada por la inserción de la <i>cassette</i> C.S3 que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina.	Sm, Sp	(Napolitano <i>et al.</i> , 2012)
CSS74	Estirpe en la que la ORF del gen <i>all3953</i> (<i>pacR</i>) ha sido inactivada por la inserción de la <i>cassette</i> C.S3, que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina.	Sm, Sp	(Picossi <i>et al.</i> , 2015)
CLUSTER-CK1	Estirpe a la que se ha sustituido el agrupamiento de tRNAs del plásmido delta por la <i>cassette</i> de resistencia a neomicina C.K1.	Nm	(Puerto-Galan & Vioque, 2012)

Tabla 2.1.- Estirpes mutantes derivadas de *Anabaena* sp. PCC 7120 utilizadas. Se muestran las estirpes de cianobacterias empleadas en este trabajo junto con una breve descripción, así como la resistencia a antibióticos y el origen de cada una de ellas.

2.1.1.2.- Medios y condiciones de cultivo

Las cianobacterias se cultivaban en el medio BG11 (Rippka *et al.*, 1979), cuya composición es: Na_2CO_3 0,2 mM, MgSO_4 0,3 mM, CaCl_2 0,24 mM, K_2HPO_4 0,2 mM, ácido cítrico 28,5 μM , citrato férrico amónico (17% Fe) 6 mg/ml, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 2,4 μM , H_3BO_3 46 μM , MnCl_2 9,1 μM , Na_2MoO_4 1,6 μM , ZnSO_4 0.8 μM , CuSO_4 0,3 μM y CoCl_2 0,2 μM . Dicho medio se preparaba partiendo de un concentrado de sales 100X que contiene todos los elementos necesarios excepto K_2HPO_4 y la fuente de nitrógeno. Para preparar el medio BG11, se añadía al combinado de sales 1X los compuestos K_2HPO_4 y NaNO_3 (como fuente de nitrógeno) a una concentración final de 0,2 mM y 17,5 mM respectivamente. En los experimentos en los que se pretendía inducir la diferenciación de heterocistos, se omitía la fuente de nitrógeno (medio BG11₀). En cambio, cuando se deseaba suministrar amonio como fuente de nitrógeno se añadía, tras autoclavar el medio BG11₀, NH_4Cl a concentración final 2,5-7,5 mM y TES-NaOH

pH 7.5 a concentración final de 10 mM.

Las células se cultivaban en condiciones axénicas a 30°C bajo iluminación continua de intensidad 75 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ en distintos formatos. Para cultivos líquidos que no requerían del aporte de CO_2 se utilizaban matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad conteniendo 50 ml de cultivo con agitación orbital de 100 rpm. Para favorecer el crecimiento rápido de *Anabaena* algunos cultivos se suplementaban con aire enriquecido en CO_2 a razón de 1% (v/v). Para ello, los cultivos en tubos de vidrio de 100 ml de capacidad (con 80 ml de cultivo) o botellas de 900 ml de capacidad (con 600-700 ml de cultivo) se suplementaban con NaHCO_3 10 mM y se aireaban a través de un cánula con una corriente gaseosa de aire y CO_2 al 1% v/v. Las estirpes resistentes a antibióticos se cultivaban en presencia de los correspondientes, que se añadían a las siguientes concentraciones finales: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomicina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ espectinomicina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ neomicina.

Para los cultivos en medio sólido se añadía Bacto-agar (*Difco*) al 1% p/v al medio BG11. El volumen necesario para el cultivo se dividía a partes iguales en dos matraces, a uno de ellos se añadía los nutrientes necesarios 2X y al otro se añadía el agar. Se autoclovaban por separado y se mezclaban antes de verter el medio en las cajas de Petri. En caso de ser necesaria la presencia de antibióticos en el medio, las concentraciones finales que se usaban fueron: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomicina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ espectinomicina y 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de neomicina.

Para cultivar las estirpes mutantes de *Anabaena* que expresan genes bajo el control del promotor inducible por cobre *PpetE*, se usaba una versión modificada del medio BG11 (que denominamos BG11- Cu^{2+}) y que carece de sales de cobre. Este medio se preparaba con agua ultrapura a partir de un concentrado de sales sin cobre y con soluciones *stock* de K_2HPO_4 y NaNO_3 tratadas previamente con la resina Chelex-100 (Bio-Rad), la cual secuestra cationes.

Para los estudios de crecimiento, los cultivos se suplementaron con diferentes inhibidores a las siguientes concentraciones: L-metionina sulfoximina (*Sigma*), 1-5 μM ; sulfometurón metilo (*Sigma*), 0,01-0,5 μM ; cloranfenicol (*Sigma*), 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y peróxido de hidrógeno (*Merck*) a 1-5 mM; N,N'-diciclohexilcarbodiimida (*Sigma*), 1-10 μM . La concentración de suplementos empleados en otros ensayos se especifican en los pies de figura que aparecen en los resultados de esta memoria.

2.1.1.3.- Método de recogida y lavado de células

Los cultivos de menos de 50 ml se recogían mediante centrifugación a temperatura ambiente durante 5 minutos a 5000 x g en una centrífuga *Eppendorf* modelo 5804-R. El

precipitado de células obtenido se lavaba con tampón Tris-HCl 50mM pH 7.5 y se procesaba de forma inmediata o se congelaba en nitrógeno líquido y se guardaba a -20°C hasta su uso. Para cultivos de mayor volumen, las células se recogían por filtración haciendo uso de filtros de nitrocelulosa *Millipore* HA de 0.45 µm de diámetro de poro. Las células se lavaban sobre el filtro con tampón Tris-HCl 50mM pH 7.5 y se resuspendían en el volumen deseado de tampón. Posteriormente se procesaban o se precipitaban las células por centrifugación y se congelaban en nitrógeno líquido para ser almacenadas a -20°C.

2.1.1.4.- Fraccionamiento celular de cianobacterias

Para el fraccionamiento celular de *Anabaena* se utilizaba el procedimiento descrito por Sobotka y colaboradores con algunas modificaciones (Sobotka *et al.*, 2008). Las células de 500-700 ml de cultivo se recogían por filtración haciendo uso de filtros *Millipore* HA de 0.45 µm de diámetro de poro. A continuación las células se lavaban sobre el filtro con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y se resuspendían en tampón T (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂ y 20% (v/v) glicerol) a razón de 5 ml/g de peso fresco. Las células de la suspensión se lisaban haciéndolas pasar 3 veces por la prensa de French a 9000 psi. El extracto obtenido se centrifugaba a 32000 x g durante 15 minutos a 4°C para eliminar las células sin romper (precipitado). El sobrenadante se ultracentrifugaba a 100000 x g durante 1h a 4°C, y se separaba la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción de membrana (*precipitado*). Para evitar contaminación cruzada entre las fracciones, se recuperaba únicamente 3/4 del volumen de sobrenadante, evitando recuperar el volumen de sobrenadante en contacto con el *precipitado*. El *precipitado* se lavaba 3 veces con tampón T y se resuspendía en el volumen deseado de tampón T suplementado con 1% (p/v) de β-dodecil-maltósido con el objetivo de favorecer la solubilización de las membranas. Para los ensayos de aminoacilación, en los que era esencial mantener la pureza de la fracción de membrana, el precipitado resultante de la ultracentrifugación se resuspendía en tampón T y se ultracentrifugaba de nuevo a 100000 x g durante 1 hora a 4°C. El precipitado obtenido se lavaba 3 veces con tampón T y se resuspendía en este mismo tampón suplementado con 1% (p/v) de β-dodecil-maltósido.

2.1.2.- *Escherichia coli*

2.1.2.1.- Estirpes de *E. coli* utilizadas

Las estirpes de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo, así como sus características genotípicas, se resumen en la Tabla 2.2.

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5α	F ⁻ supE44 hsdR17 (r _k -m _k +) recA1 girA96 (NaI ^r) endA1 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF) (Δ80lacZAM15) U169	(Hanahan, 1983)
HB101	F ⁻ hsdS20(r _B -m _B -) leu supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xy-5mtl-1 recA13 mcrB	(Boyer & Roulland-dussoix, 1969)
ED8654	lac-3 o lacY1 supE44 supF58 hsdR514 (r _k ⁻ m _k ⁻) recA56 mcrA1 metB1 lacY galK2 galT22 trp55	(Murray et al., 1977)

Tabla 2.2.- Estirpes de *E. coli* utilizadas. Estirpes empleadas en este trabajo junto con sus características más importantes.

2.1.2.2.- Medios y condiciones de cultivo

Las distintas estirpes de *E. coli* se cultivaban de forma axénica en medio rico Luria-Bertani (LB) que se compone de 10 g/L NaCl, 10 g/L bactotriptona y 5 g/L de extracto de levadura (Sambrook & Russell, 2001). Si se quería cultivar en medio sólido, se añadía agar a una concentración de 1.5% p/v antes de autoclavar. En caso necesario se añadían antibióticos al medio una vez autoclavado a una concentración final de: 25 µg/ml estreptomicina, 100 µg/ml espectinomicina, 25 µg/ml kanamicina, 50 µg/ml ampicilina y 30 µg/ml de cloranfenicol.

Los cultivos líquidos se incubaban a 37°C con agitación orbital a 200 rpm, mientras que los cultivos sólidos en cajas de Petri se hacían crecer a 37°C en una estufa.

2.1.2.3.- Métodos de recogida y lavado de células

Para la recogida de volúmenes inferiores o iguales a 1.5 ml las células se recogían por centrifugación en una microcentrífuga *Labnet* modelo *spectrafuge-24D* a 13000 x *g* durante 30 segundos. Para volúmenes de 1.5 a 50 ml las células se centrifugaban en una centrífuga *Eppendorf 5804R* a 5000 x *g* durante 5 minutos, y para volúmenes superiores a 50 ml se utilizaba la centrífuga *Beckman Coulter Avanti J-25* con el rotor JA 25.50 a 40000 x *g* durante 10 minutos. El precipitado de células obtenido se lavaba varias veces con tampón Tris-HCl 50mM pH 7.5 y se procesaba inmediatamente o, de lo contrario, se congelaba en nitrógeno líquido y se guardaba a -20°C.

2.2.- Procedimientos genéticos

2.2.1.- Transferencia de DNA a *E. coli* mediante transformación

Las células transformables de *E. coli* de las estirpes DH5α y HB101, preparadas según el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1983), se obtuvieron del Servicio de Cultivos

Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Para su transformación genética por choque térmico se mezclaban 100 µl de células transformables con un volumen aproximado de 15 µl conteniendo 10-50 ng de DNA. La mezcla se incubaba 15 minutos en hielo, 90 segundos a 42°C y otros 5 minutos en hielo. Tras ello, se añadía 1 ml de medio LB estéril y se incubaban las células 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente se sembraban las células en placas de Petri con 25 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de transformantes. En los casos en los que era posible la identificación de transformantes que han incorporado plásmido con inserto mediante complementación α , el medio se suplementaba además con 40 µg/ml de X-gal (*Fermentas*) (Sambrook & Russell, 2001). En este caso, las colonias que habían introducido el plásmido con inserto se mostraban de color blanco, mientras que las que incorporan el plásmido sin inserto eran de color azul.

2.2.2.- Transferencia de DNA a *E. coli* mediante electroporación

Las células electroporables eran proporcionadas por el Servicio de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Para la transferencia de material genético a *E. Coli* se mezclaban 100 µl de células previamente descongeladas en hielo con el DNA transformante (15 µl si se trataba de una mezcla de ligación ó 1 µl si se trataba de un plásmido purificado). La mezcla se pasaba a cuvetas de electroporación de 2 mm de separación entre electrodos (*Cell Projects*), previamente enfriadas en hielo, y se procedía a la electroporación utilizando un electroporador *Easyject Optima* (*EquiBio*). Posteriormente se añadía 1 ml de LB estéril y se cultivaba a 37°C durante 1 hora. Finalmente la suspensión celular se sembraba en cajas de Petri conteniendo medio LB sólido con los antibióticos necesarios.

2.2.3.- Transferencia de DNA a *Anabaena* mediante conjugación triparental

La transferencia de DNA a *Anabaena* se realiza siguiendo el protocolo de conjugación triparental establecido por Elhai & Wolk (Elhai & Wolk, 1988). En este proceso entran en juego dos estirpes de *E. coli* y la cianobacteria receptora *Anabaena sp.* PCC 7120. Una de las estirpes de *E. coli* es HB101, que porta el plásmido a transferir o plásmido cargo, el cual contiene el fragmento de DNA que se quiere introducir en la cianobacteria, y un plásmido auxiliar (pRL623) que codifica para las metilasas de las endonucleasas de restricción residentes en *Anabaena*: Ava I, Ava II y Ava III (Elhai *et al.*, 1997). Las metilaciones catalizadas por estas enzimas protegen al plásmido cargo de ser digerido a su entrada en la cianobacteria. La otra estirpe de *E. coli* es ED8654, que posee el plásmido conjugativo pRL443, que cifra los genes necesarios para la movilización del plásmido cargo a la cianobacteria receptora.

Para realizar la conjugación se inoculaban cultivos independientes de 10 ml de medio LB (suplementado con los antibióticos adecuados) con 350 μ l de cultivo en fase estacionaria de HB101 (conteniendo el plásmido a transferir) o con 250 μ l de cultivo en fase estacionaria de la estirpe ED8654 (pRL443). Ambos inóculos se incubaban durante 2.5 horas a 37°C en agitación (200 rpm) y, una vez alcanzada la fase exponencial, se recogían las células y se lavaban con 10 ml de medio LB dos veces mediante centrifugación y resuspensión suave para eliminar los antibióticos. Los precipitados celulares se resuspendían suavemente en 200-300 μ l de medio LB y se mezclaban ambas estirpes de *E. coli*. Esta mezcla se incubaba a 30°C durante 2 horas cuidando que no sufran movimientos bruscos, pues en este tiempo han de conjugarse para que HB101 reciba el plásmido conjugativo pRL443. Tras ello, las estirpes de *E. coli* se mezclaban con una suspensión celular de *Anabaena* que debía contener 10 μ g de clorofila en un volumen de 300-400 μ l. La mezcla resultante se extendía sobre un filtro de nitrocelulosa tipo HAWP de 0.45 μ m (Millipore) dispuesto sobre una placa de Petri con medio BG11 (sin antibióticos) suplementado con un 5% (v/v) de LB, de forma que tanto *Anabaena* como *E. coli* puedan crecer para establecer la conjugación entre ambas especies. Esta placa se incubaba 2 horas a 30°C a baja intensidad de luz y luego 22 horas a 30°C a una intensidad continua de luz de 75 μ E/(m²·s), condiciones que se mantendrán durante todo el proceso de conjugación. Tras 24 horas, el filtro se transfería a una placa de Petri con medio BG11 (sin antibióticos) y se incubaba en las mismas condiciones durante 24 horas. Posteriormente, el filtro se transfería a placas de Petri con medio selectivo al que se añadía los antibióticos pertinentes para seleccionar las células de *Anabaena* que habían recibido el plásmido cargo. Cada 2 días se transfería el filtro a una placa de medio fresco con antibióticos. Las colonias resistentes al antibiótico comenzaban a aparecer a los 10-15 días de incubación en el medio selectivo.

Para la selección de clones de *Anabaena* que hubieran incorporado el DNA transferido mediante doble recombinación con su genoma, se utilizaban los plásmidos pRL277 o pRL278 (o derivados de estos) como vectores. Estos vectores, además de no replicarse en *Anabaena*, portan el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* que confiere sensibilidad a sacarosa (Cai & Wolk, 1990). Para seleccionar dobles recombinantes, las colonias resultantes de la conjugación, que en su mayoría corresponden a clones que han integrado el plásmido por recombinación simple, se sembraban por agotamiento en medio BG11 sólido con antibióticos, incubando en condiciones estándar de cultivo hasta que aparecían nuevas colonias aisladas. Este proceso se repetía 3 veces, tras lo cual se inoculaban colonias aisladas en medio BG11 líquido durante una semana. Para favorecer la segregación cromosómica, alícuotas del cultivo se sometían a una sonicación suave para fragmentar el filamento en unidades de 3-4 células por filamento y luego se sembraban diluciones seriadas en placas de BG11 suplementadas con 5% de sacarosa (p/v). El

gen *sacB* presente en el plásmido cargo resulta letal en presencia de sacarosa, de manera que es adecuado para contraseleccionar los recombinantes simples (aquellos que conservan el plásmido integrado en el cromosoma como consecuencia de un único evento de recombinación) y seleccionar recombinantes dobles, en los que el gen *sacB* con el resto del vector se escinde del genoma y se pierde. Para distinguir dobles recombinantes de aquellos clones resistentes a sacarosa que surgen a consecuencia de una mutación en el gen *sacB*, se ensayaba la capacidad de crecimiento de las colonias resistentes a sacarosa en un medio suplementado con los antibióticos correspondientes a los genes de resistencia del plásmido cargo y se seleccionaban los clones sensibles al antibiótico.

2.3.- Técnicas analíticas

2.3.1.- Manipulación y análisis del DNA

2.3.1.1.- Plásmidos utilizados

2.3.1.1.1.- Plásmidos utilizados como vectores de clonación o como ayudantes en experimentos de conjugación.

Los plásmidos que se muestran en la Tabla 2.3 han sido utilizados en este trabajo pero no han sido generados durante el desarrollo del mismo.

Plásmido	Descripción	Resistencia	Origen
pCSV3	vector derivado de pRL500 en el que el gen de resistencia a Ap ha sido reemplazado por la <i>cassette</i> C.S3.	Sm, Sp	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2006)
pCSRO	Vector derivado de pRL500 en el que el gen de resistencia a Ap ha sido reemplazado por la <i>cassette</i> C.S3 y al que se le ha insertado el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> para selección positiva.	Sm,Sp	(Merino-Puerto <i>et al.</i> , 2010)
pRL25C	Vector de expresión para cianobacterias.	Km	(Wolk <i>et al.</i> , 1988)
pRL277	Vector movilizable por conjugación utilizado para la selección positiva de dobles recombinantes en <i>Anabaena</i> . Contiene el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .	Sm, Sp	(Black <i>et al.</i> , 1993)
pRL278	Vector movilizable por conjugación utilizado para la selección positiva de dobles recombinantes en <i>Anabaena</i> . Contiene el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .	Km	(Black <i>et al.</i> , 1993)
pCSEL24	Plásmido derivado de pBR322 con un fragmento de 2 Kb que incluye el gen <i>nucA</i> inactivado, y parte del gen <i>nuiA</i> de <i>Anabaena</i> clonado entre los sitios EcoRI-EcoRV. Contiene a su vez la <i>cassette</i> de resistencia a estreptomicina y	Sm, Sp	(Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2006)

	espectinomycin C.S3 en el sitio BamHI.		
pRL443	Plásmido conjugativo de amplio espectro, derivado de RP4, capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1.	Ap	(Elhai & Wolk, 1988)
pRL623	Vector derivado de ColK, portador de los genes <i>mob</i> y los genes de las metilasas de sitios <i>AvaI</i> , <i>AvaII</i> y <i>AvaIII</i> .	Cm	(Elhai <i>et al.</i> , 1997)
pSparkI	Vector comercial para la clonación de fragmentos obtenidos por PCR.	Ap	Canvax

Tabla 2.3.- Plásmidos utilizados como vector de clonación o como ayudantes en experimentos de conjugación. Lista de los plásmidos empleados junto con una breve descripción, así como la resistencia a antibióticos que confieren y el origen de los mismos.

2.3.1.1.2.- Plásmidos generados en este trabajo

Para la realización de este trabajo se generaron una serie de plásmidos que se resumen en la Tabla 2.4.

Plásmido	Descripción	Resistencia
pCJS15	Fragmento de DNA de 1.6 Kb que incluye las regiones flanqueantes a la secuencia que codifica para el dominio CAAD del gen <i>valS</i> de <i>Anabaena</i> clonado entre los sitios NruI y XhoI de pRL278.	Km
pCJS35	Fragmento de DNA de 4 Kb que incluye 1 Kb del gen <i>all4723</i> , la <i>cassette</i> C.K3 y la fusión entre los genes <i>atpA</i> y <i>gfp</i> . Este fragmento se clonó en el sitio HincII de pRL479. En esta construcción se expresa la fusión <i>atpA::gfp</i> bajo el control del promotor <i>PpsbA</i> incluido en la <i>cassette</i> C.K3.	Ap, Km
pCJS51	Fragmento de DNA de 1.2 Kb que incluye el promotor <i>PpetE</i> aguas arriba del gen <i>gfp</i> , y una secuencia que actúa como sitio de clonación múltiple procedente del vector pSpark I. Este fragmento se clonó entre los sitios EcoRI de pCSV3.	Sm, Sp
pCJS52	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>all2436</i> , que codifica para la AspRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::AspRS.	Sm, Sp
pCJS53	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>all0233</i> , que codifica para la MetRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::MetRS.	Sm, Sp
pCJS55	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>gltX</i> , que codifica para la GluRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::GluRS.	Sm, Sp
pCJS56	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>argS</i> , que codifica para la ArgRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::ArgRS.	Sm, Sp
pCJS57	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen	Sm, Sp

	<i>all4845</i> , que codifica para la subunidad alfa de la PheRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::PheRS α .	
pCJS58	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>cysS</i> , que codifica para la CysRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::CysRS.	Sm, Sp
pCJS59	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>ileS</i> , que codifica para la IleRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::IleRS.	Sm, Sp
pCJS60	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>leuS</i> , que codifica para la LeuRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::LeuRS.	Sm, Sp
pCJS61	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>trpS</i> , que codifica para la TrpRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::TrpRS.	Sm, Sp
pCJS62	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>tyrS</i> , que codifica para la TyrRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::TyrRS.	Sm, Sp
pCJS63	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>hisS</i> , que codifica para la HisRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::HisRS.	Sm, Sp
pCJS64	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>thrS1</i> , que codifica para la ThrRS1 de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::ThrRS1.	Sm, Sp
pCJS65	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>alr5053</i> , que codifica para la ProRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::ProRS.	Sm, Sp
pCJS66	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>serS</i> , que codifica para la SerRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::SerRS.	Sm, Sp
pCJS67	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende 1 Kb de la ORF del gen <i>all3951</i> de <i>Anabaena</i> , clonado en BamHI de pCJS51. Sobreexpresa la proteína GFP.	Sm, Sp
pCJS68	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>thrS2</i> , que codifica para la ThrRS2 de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::ThrRS2.	Sm, Sp
pCJS69	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>alr3658</i> , que codifica para la AsnRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::AsnRS.	Sm, Sp
pCJS70	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>lysS</i> , que codifica para la LysRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI	Sm, Sp

	y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::LysRS.	
pCJS71	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>alr2418</i> , que codifica para la AlaRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::AlaRS.	Sm, Sp
pCJS72	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>glyQ</i> , que codifica para la subunidad alfa de la GlyRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::GlyRS α .	Sm, Sp
pCJS73	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende 750 pb del gen <i>argRSC</i> de <i>Anabaena</i> , clonado en el sitio XhoI de pCJS51.	Sm, Sp
pCJS74	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF del gen <i>valS</i> , que codifica para ValRS de <i>Anabaena</i> , clonado entre los sitios BamHI y XhoI de pCJS51. Sobreexpresa la fusión GFP::ValRS.	Sm, Sp
pCJS83	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la ORF de la LeuRS de <i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106, clonado en el sitios BamHI y XhoI de pCJS73.	Sm, Sp
pCJS122	Plásmido que contiene clonada la fusión <i>Ppats::gfp::caad</i> entre los sitios PstI-SacI de pCSEL24. Sobreexpresa la fusión GFP::CAAD a partir del promotor del gen <i>patS</i> de <i>Anabaena</i> .	Sm, Sp
pCJS123	Plásmido que contiene clonada la fusión <i>PhetN::gfp::caad</i> entre los sitios PstI-SacI de pCSEL24. Sobreexpresa la fusión GFP::CAAD a partir del promotor del gen <i>hetN</i> de <i>Anabaena</i> .	Sm, Sp
pCJS124	Plásmido que contiene clonada la fusión <i>PsusA::gfp::caad</i> entre los sitios PstI-SacI de pCSEL24. Sobreexpresa la fusión GFP::CAAD a partir del promotor del gen <i>susA</i> de <i>Anabaena</i> .	Sm, Sp
pCJS132	Plásmido que contiene clonada la fusión <i>Ppats::gfp</i> entre los sitios PstI-SacI de pCSEL24. Sobreexpresa la proteína GFP a partir del promotor del gen <i>patS</i> de <i>Anabaena</i> .	Sm, Sp
pCJS133	Plásmido que contiene clonada la fusión <i>PhetN::gfp</i> entre los sitios PstI-SacI de pCSEL24. Sobreexpresa la proteína GFP a partir del promotor del gen <i>hetN</i> de <i>Anabaena</i> .	Sm, Sp
pCJS134	Plásmido que contiene clonada la fusión <i>PsusA::gfp</i> entre los sitios PstI-SacI de pCSEL24. Sobreexpresa la proteína GFP a partir del promotor del gen <i>susA</i> de <i>Anabaena</i> .	Sm, Sp

Tabla 2.4. Plásmidos generados en este trabajo. Lista de los plásmidos generados durante este trabajo junto con una breve descripción, así como la resistencia a antibióticos que confieren.

2.3.1.2.- Aislamiento de DNA

El DNA plásmídico se aislaba de cultivos de 3-5 ml de *E. coli* crecidos durante 18-24 horas a 37°C en medio rico LB haciendo uso del *kit* comercial *NucleoSpin Plasmid* (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.1.3.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para la separación y análisis de moléculas de DNA se realizaban electroforesis en geles de agarosa (Sambrook & Russell, 2001) de concentración variable entre el 0.6% y 1% (p/v) con tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM pH 8). Para visualizar el DNA, al gel se añadía bromuro de etidio a concentración de 1 mg/ml. Antes de cargar las muestras, a éstas se añadía 1/6 del volumen de tampón de carga 6X compuesto por glicerol 50% (p/v), azul de bromofenol 0.4% (p/v) y xilenecianol FF 0.4% (p/v). La electroforesis se llevaba a cabo en cubetas de electroforesis *Apollo Instruments* (modelos 75.710 y 75.1214) en tampón TBE a 80-120 voltios durante un tiempo variable entre 30 minutos y 1 hora según el propósito de la electroforesis. Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA se cargaba, en paralelo con las muestras, 6 µl de un marcador de DNA de peso molecular conocido (*Gene Ruler™ de Thermo Scientific*). El DNA se visualizaba haciendo uso de un transiluminador ultravioleta.

2.3.1.4.- Determinación de la concentración de DNA

La concentración de DNA en una muestra se determinaba en una electroforesis en gel de agarosa comparando la intensidad del fragmento de DNA cuya concentración se quería determinar con la intensidad de las bandas de un marcador de DNA cuya concentración es conocida.

En algunas ocasiones la concentración de DNA se determinaba espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro *NanoDrop* modelo *ND-100*.

2.3.1.5.- Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA de interés, separados por electroforesis en geles de agarosa, se purificaban recortando con un bisturí el trozo de agarosa en el que se encuentra inmerso el fragmento de DNA. Posteriormente, el DNA se extraía del trozo de agarosa haciendo uso del kit comercial *Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline)* siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.3.1.6.- Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se realizaba en un termociclador *MJ MINI Personal Thermal Cycler (Bio-Rad)*. La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 20 a 50 µl y la mezcla de reacción contenía 1–10 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada oligonucleótido y la DNA polimerasa con su tampón correspondiente. En algunos casos la mezcla se suplementaba con MgCl₂ a concentración 2 mM cuando el

fabricante no lo incluía en el tampón suministrado (Tabla 2.5). El programa utilizado constaba típicamente de una etapa de desnaturalización inicial a 94-98°C de 30 segundos a 5 minutos seguido de 25-35 ciclos de amplificación, cada uno de ellos con etapas de: desnaturalización durante 10-30 segundos a 94°C o 98°C dependiendo de la DNA polimerasa utilizada (Tabla 2.5), apareamiento durante 30 segundos a una temperatura variable que dependía de los oligonucleótidos utilizados y extensión a 72°C durante un tiempo variable que dependía del tamaño del fragmento a amplificar y de la velocidad de la DNA polimerasa que se utilizaba. El resultado de la amplificación se analizaba mediante electroforesis en geles de agarosa según se describe en el apartado 2.3.1.3.

En la Tabla 2.6 se detallan los diferentes oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR de este trabajo, a excepción de los utilizados para la generación de sondas de DNA radiactivas (apartado 2.3.1.9), ensayos de 5' RACE (apartado 2.3.2.6) y de RT-PCR de polisomas (apartado 2.3.4.5.2).

DNA Polimerasa	Unidades Enzima/reacción	Tampón 1X	Procesividad
BioTaq (<i>Bioline</i>)	1	(NH ₄) ₂ SO ₄ 16,6 mM, Tris-HCl 67 mM, (pH 8,8), 0,1% Tween-20 (necesario suplementar con MgCl ₂ 2mM)	30 segundos/Kb
iProof High Fidelity DNA Polymerase (<i>BioRad</i>)	0.2-0.5	Tampón comercial (incluye MgCl ₂)	15-30 segundos/Kb

Tabla 2.5. DNA polimerasas utilizadas. Lista de las polimerasas usadas en este trabajo junto con las características más relevantes.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
A7120-valS-17F	AAGATCTCGAGGTCAGCGAACAA	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.9 Kb que comprende el dominio CAAD de ValRS de <i>Anabaena</i> y 800 pb aguas arriba y abajo del mismo. Utilizados para la construcción del mutante ValRSΔCAAD.
A7120-valS-15R	TTACCTCGAGTAGGAATCACTATC	
A7120-valS-8F	GTACAGCAAGCGCCAGAAGC	Pareja de oligonucleótidos que amplifican, por PCR divergente del plásmido pCJS10, un fragmento de

A7120-valS-7R	AGCAGCAATGGTCAAAGTCTCC	4.6 Kb consistente en el vector con 800 pb aguas arriba y abajo del dominio CAAD. Utilizados para la construcción del mutante ValRSΔCAAD.
atpA-3F	AAGGATCCACACATGAGCATTCAATTAA	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.5 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>atpA</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados para la generación de la fusión <i>atpA::gfp</i> .
atpA-3R	CGCTGTAGCTTTGAAGGTCTTT	
linker atpA-GFP	GACCTTCAAAGCTACAGCGATGAGTAAAGGAGAAGA ACTTT	Pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 725 pb correspondiente a la ORF del gen <i>gfpmut2</i> . Utilizados en la generación de la fusión <i>atpA::gfp</i> .
GFPmut2-1R	TATGGATCCTTATTGTATAGTTCATCCATGC	
A7120-ThrRS2-3F	GGAAGAGCTCTGGTCATTTTGAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1 Kb de la ORF del gen <i>all4723</i> . Utilizados en la generación de la fusión <i>atpA::gfp</i> .
A7120-ThrRS2-5R	GTACGTCGACTCAACTTCAGCAATC	
CK3-2F	CTAGTCGACCTCAATGAATATTGG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 960 pb correspondiente a la cassette C.K3. Utilizados en la generación de la fusión <i>atpA::gfp</i> .
CK3-1R	GAAATCTCGAGATGGCAGGTTG	
pSpark-1F	GCTGCATGCCGATTAAGTTGG	Pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 4 Kb correspondiente a 1 Kb del gen <i>all4723</i> , la cassette C.K3 y la fusión entre los genes <i>atpA</i> y <i>gfp</i> . Utilizados en la generación de la fusión <i>atpA::gfp</i> .
pSpark-1R	GAATACGCATGCTATGCATCCAAC	
GFP-mut2-1F	GAAGGAGCATATGAGTAAAGGAGAAGAAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 720 pb correspondiente a la ORF del gen <i>gfpmut2</i> . Utilizados en la construcción del vector de expresión en <i>Anabaena</i> pCJS51.
GFPmut2-2R	CCTCCTCCTTTGTATAGTTCATCCATGCC	
PpetE-3F	CACAGAATTCAGAACACAGTACTC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 400 pb correspondiente al promotor de la plastocianina <i>PpetE</i> . Utilizados en la construcción del vector de expresión en <i>Anabaena</i> pCJS51.
PpetE-2R	TTCAAGGCCTTCTCCTAACCTG	

pCJS49-1F	AACGAATTCAGAACACAGTACTC	Pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 1.2 Kb que incluye el promotor <i>PpetE</i> aguas arriba del gen <i>gfpmut2</i> y una secuencia que actúa como sitio de clonación múltiple procedente del vector pSparK I. Utilizados en la construcción del vector de expresión en <i>Anabaena</i> pCJS51.
pCJS49-1R	ATAGAATTCTCAAGCTATGCATC	
A7120-AspRS-1F	TTAGGATCCATGCGAACTCAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.8 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>all2436</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::AspRS.
A7120-AspRS-1R	CATTCTCGAGAATCCAGGTATC	
A7120-MetRS-1F	TTAGGATCCATGAATCTAGTG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.6 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>all0233</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::MetRS.
A7120-MetRS-1R	GAACTCGAGCTGAATTAGCTT	
A7120-GluRS-2F	ACTGGATCCGTTAGAGTCAGAATC	Pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 1.5 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>gltx</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::GluRS.
A7120-GluRS-3R	GGCTCGAGATTGCCACCAC	
A7120-ArgRS-1F	TATGGATCCGCTACACAAGAAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.7 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>argS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::ArgRS.
A7120-ArgRS-1R	CTTCTCGAGTTACTTTATCAATAGC	
A7120-PheRSalpha-1F	CTAAGGATCCATGACTAGCAAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>all4845</i> , que codifica para la subunidad α de PheRS de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::PheRS α .
A7120-PheRSalpha-1R	GAATGCTCGAGTCTGAGTTTTTC	
A7120-CysRS-1F	GTTGGATCCCTAACGATTTAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.5 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>cysS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::CysRS.
A7120-CysRS-1R	GTTCTCGAGGTAATAGCTTTG	
A7120-IleRS-1F	GCTGGATCCGAAACTGGAAGTTAC	Pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 2.9 Kb

A7120-IleRS-1R	GATGTCTCGAGCTACAGGTGATTG	correspondiente a la ORF del gen <i>ileS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::IleRS.
A7120-LeuRS-1F	GAAGGATCCGTGGACTCCCGATAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 2.6 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>leuS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::LeuRS.
A7120-LeuRS-1R	GACTCGAGGAAAGACAGCTTTGG	
A7120-TrpRS-1F	CTAGGATCCATGGGTAAGCAG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>trpS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::TrpRS.
A7120-TrpRS-1R	TTGCTCGAGGCATAAATTAAAC	
A7120-TyrRS-1F	GTGGATCCGAAAATTTTCTTGG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.2 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>tyrS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::TyrRS.
A7120-TyrRS-1R	CCCCTCGAGCCTCTAAGGTAC	
A7120-HisRS-1F	GAGGATCCGCAAAAAACGAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.4 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>hisS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::HisRS.
A7120-HisRS-1R	TACTCGAGGCACAGAAAAGAG	
A7120-ThrRS1-1F	CTAGGATCCCAGCAGCTAATG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.8 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>thrS1</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::ThrRS1..
A7120-ThrRS1-1R	TTCTCGAGGGGTCATACCCAG	
A7120-ProRS-1F	GAAGGATCCATGCGACTGTCAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.8 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>alr5053</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::ProRS.
A7120-ProRS-1R	TTTCTCGAGCTGCATTCTCTG	
A7120-SerRS-1F	GAAGGATCCGTGCTGGATATTAAG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.3 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>serS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::SerRS.
A7120-SerRS-1R	AACTCGAGAGTGCTTTGTATCAG	
A7120-argRSC-7F	CTTGATCCTAACAGCGTCAG	Pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 1 Kb interno a la ORF del gen <i>all3951</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados para la construcción del plásmido pCJS67.
A7120-argRSC-7R	CAGTGGATCCTGAGTGACTTCTG	

A7120-ThrRS2-4F	ATTGGATCCGTCAGTTCCTTAAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.8 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>thrS2</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::ThrS2.
A7120-ThrRS2-6R	CTGCTCGAGGATTTTGTATTG	
A7120-AsnRS-1F	GGGGATCCATGGTAAATCGAC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.4 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>alr3658</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::AsnRS.
A7120-AsnRS-1R	CACCTCGAGTTATTTGACGACTG	
A7120-LysRS-1F	GTTCCGATCCATGTCGGAAGAAG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 1.7 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>lysS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::LysRS.
A7120-LysRS-1R	GACCTCGAGAACGTCAAACCC	
A7120-AlaRS-1F	CTGGATCCTCTTCAAACCCG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 2.7 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>alr2418</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::AlaRS.
A7120-AlaRS-1R	CCTCTCGAGTTAATTCTCACGC	
A7120-GlyRSalpha-1F	GAGGATCCAGTATGAATTTTC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 950 pb correspondiente a la ORF del gen <i>glyQ</i> , que codifica para la subunidad α de GlyRS. Utilizados en la generación de la fusión GFP::GlyRS α .
A7120-GlyRSalpha-1R	GGCTCGAGAAATATTACTAAG	
A7120-ValRS-1F	CAGAGGATCCGCAACTATAACC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 3.1 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>valS</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados en la generación de la fusión GFP::ValRS.
A7120-ValRS-1R	CTAAATCTCGAGGGTGATGCCTAC	
A7120-argRSC-8F	GCCCCTCGAGAAAACCAAGTGATC	Pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 750 pb interno a la ORF del gen <i>all3951</i> de <i>Anabaena</i> . Utilizados para la creación de un plataforma de recombinación por homología en <i>Anabaena</i> .
A7120-argRSC-8R	CAAAGTCGACACTGGCTCCAAAAAG	
LY8106-LeuRS-1F	GTTGGATCCGTGGAGTCTCG	Pareja de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 3 Kb correspondiente a la ORF del gen <i>leuS</i> de <i>Lyngbya sp.</i> PCC 8106. Utilizados para la creación de la fusión GFP::LeuRS.
LY8106-LeuRS-1R	GACTCGAGACGGGATTATTAG	

Tabla 2.6. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR. Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo donde se detalla la secuencia nucleotídica así como el propósito de cada cebador.

2.3.1.7.- Secuenciación del DNA

Para la secuenciación de fragmentos de DNA se hacía uso de un servicio de secuenciación externo perteneciente a la empresa Secugen S.L. empleando, según el fragmento de DNA a secuenciar, cebadores específicos diseñados para la secuenciación o cebadores aportados por el propio servicio.

2.3.1.8.- Tratamientos enzimáticos del DNA

Cuando se quería digerir el DNA por secuencias específicas se empleaban endonucleasas de restricción de la línea *Fast-Digest* de la casa comercial *Thermo Scientific* atendiendo a las instrucciones del fabricante. Típicamente, las reacciones de digestión se llevaban a cabo en un volumen variable entre 20 y 30 μ l, añadiendo 100-500 ng del DNA sustrato e incubando a 37°C durante 10-30 minutos. Cuando era necesario, las enzimas se inactivaban incubando a 80°C durante 5 minutos, o bien se eliminaban separándolas del producto de la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.3.1.3).

En algunas clonaciones, para evitar la religación del vector, era necesario eliminar el grupo fosfato de los extremos 5' del DNA. En ese caso, se llevaba a cabo una defosforilación del DNA haciendo uso de la fosfatasa alcalina *FastAP* de *Thermo Scientific*. La reacción se hacía en 20 μ l de volumen final añadiendo 1 unidad de enzima, 200-500 ng del DNA sustrato e incubando a 37°C durante 30 minutos siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cuando era posible, la enzima se inactivaba incubando a la temperatura indicada por el fabricante durante el tiempo indicado, tras lo cual el DNA podía ser usado en posteriores reacciones enzimáticas.

Cuando era necesario rellenar extremos 3' recesivos para convertirlos en extremos romos, se incubaba el DNA a 37°C durante 1 hora con 2 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (*Fermentas*) en presencia de dNTPs a una concentración final de 0.05 mM y el tampón suministrado por el fabricante (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 50 μ g/ml BSA). Para inactivar la enzima, se incubaba a 65°C durante 10 minutos.

Para la ligación de fragmentos de DNA se utilizaba la DNA-ligasa del bacteriófago T4 proporcionada por *Dominion MLB*. La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 15 μ l con 20 ng de vector y una cantidad de DNA inserto tal que la relación molar vector:inserto fuera de 1:3 (para fragmentos de DNA con extremos cohesivos) o de 1:5 (para extremos romos). A la mezcla de reacción se añadía 1 unidad de enzima, se suplementaba con el tampón proporcionado por el fabricante y se incubaba a 22°C durante 2-16 horas. Finalmente, la enzima se inactivaba a 65°C durante 15 minutos, tras lo cual la mezcla de ligación se utilizaba

para la transformación de *E. coli* mediante choque térmico (apartado 2.2.1) o electroporación (apartado 2.2.2).

2.3.1.9.- Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA

Para marcar radiactivamente el DNA se partía de fragmentos obtenidos previamente por PCR. 20 ng de DNA bicatenario se marcaban con 25 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (3000 Ci/mmol) usando el kit comercial *Redprime II Random Prime Labelling System* (GE-Healthcare) basado en la extensión a partir de cebadores de secuencia aleatoria. La mezcla de reacción comercial se proporciona liofilizada, por lo que se rehidratava con 25 μl de agua 20 minutos antes de ser usada. La mezcla contiene dATP, dGTP, dTTP, 4-8 unidades de enzima Klenow y una amalgama de oligonucleótidos de secuencia aleatoria. 20 ng de DNA previamente desnaturalizado se incubaban 30 minutos a 37°C con la mezcla de reacción hidratada y con la $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$. Finalmente, el $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ no incorporado se eliminaba por filtración en gel. Tras cuantificar la radiactividad incorporada mediante un contador de centelleo *Beckman* modelo LS 6000, se utilizaba el fragmento de DNA marcado como sonda radiactiva en experimentos de northern blot (apartado 2.3.2.4).

En algunos experimentos se utilizaron sondas de DNA monocatenario de secuencia complementaria a los tRNAs. Estas sondas se generaban alineando un oligonucleótido de 75 nt (Tabla 2.7) y se secuencia idéntica a la cadena con sentido del gen del tRNA correspondiente con un oligonucleótido de 17 nt complementario al extremo 5' del primero (Tabla 2.7). Ambos oligonucleótidos se alineaban mezclando 10 pmol del oligo largo con 100 pmol del oligo corto en un volumen de 34.5 μl . Tras incubar a 100°C durante 3 minutos, la mezcla se dejaba enfriar a temperatura ambiente, se le añadía 5 μl de tampón comercial 10X (*Thermo Scientific*) (500 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM MgCl_2 , 10 mM DTT), dATP, dGTP y dTTP a concentración final 0.03 mM, 25-50 μCi $^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ y 10 unidades de enzima, y se incubaba durante 30 minutos a 37°C. Tras ello se añadía dCTP frío a concentración final 0.03 mM y se incubaba otros 5 minutos a 37°C. Los nucleótidos no incorporados se eliminaban por filtración en gel.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
tRNA_Asp_GTC-1F	GGGACTGTAGTTCAATTGGTTAGAGCACCGCCTGTCACGG CGGAAGTTGCGGGTTCGAGCCCCGTCAGTCCCG	Pareja de oligonucleótidos utilizada para generar una sonda de DNA monocatenario complementaria al tRNA ^{Asp} (GTC)
tRNA_Asp_GTC-1R	CGGGACTGACGGGGCTC	

tRNA_Met_CAT-1F	CGCGGGATAGAGCAGCCTGGTAGCTCGTCGGGC TCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTT CCCGCCA	Pareja de oligonucleótidos utilizada para generar una sonda de DNA monocatenario complementaria al tRNA ^{Met} iniciador
tRNA_Met_CAT-1R	TGGCGGGAAGTGGATTG	

Tabla 2.7. Oligonucleótidos empleados para la generación de sondas radiactivas. Relación de oligonucleótidos utilizados como cebadores para la obtención de los fragmentos de DNA empleados como sondas radiactivas en los análisis de northern blot. Se detalla la secuencia nucleotídica de cada cebador así como el gen que amplifica.

2.3.2.- Manipulación y análisis del RNA

2.3.2.1.- Aislamiento de RNA de cianobacterias

Durante este trabajo se han utilizado dos métodos distintos para extraer RNA de *Anabaena* dependiendo de la población de RNA que se quería aislar.

A. Aislamiento de RNA total. Para el aislamiento de RNA total se utilizaba un protocolo modificado basado en el método del fenol caliente de Mohamed y Jansson (Mohamed & Jansson, 1989). Las células procedentes de un cultivo de 40 ml se recogía mediante filtración con filtros de nitrocelulosa como se describe en el apartado 2.1.1.3, se lavaban con T₅₀E₁₀₀ (50 mM Tris-HCl pH 7.5 y 100 mM EDTA pH 8) y se congelaban en nitrógeno líquido. El precipitado celular se resuspendía en 300 µl de tampón de resuspensión (300 mM sacarosa, 10 mM acetato sódico pH 4.5). A continuación se añadía 100 µl de 250 mM Na₂-EDTA pH 8, 400 µl de tampón de lisis (SDS 2%, acetato sódico 10 mM pH 4.5) y 1 ml de fenol ácido equilibrado con agua (*Amresco*) precalentado a 65°C. La mezcla se incubaba 2.5 minutos a 65°C, se mezclaba y se volvía a incubar otros 2.5 minutos a 65°C. A continuación se centrifugaba la mezcla a 15000 x g durante 5 minutos a 4°C y se recogía la fase acuosa, la cual se extraía otra vez con fenol a 65°C, luego con una mezcla de fenol:cloroformo (1:1, [v:v]) a 65°C y finalmente con cloroformo (*Merck*). Los ácidos nucleicos se precipitaban con 1/5 del volumen de 10 M LiCl y 2 volúmenes de etanol. Para facilitar la precipitación se sumergían los tubos en nitrógeno líquido, tras lo cual se centrifugaban a 15000 x g durante 30 minutos a 4°C. Los ácidos nucleicos precipitados se lavaban con etanol al 70% (v/v) y se secaban a temperatura ambiente. Por último, el precipitado de ácidos nucleicos se resuspendía en 90 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se realizaba un tratamiento a 37°C durante 30 minutos con 10 unidades de DNasa I-turbo (*Ambion*) en el tampón suministrado por el fabricante. Posteriormente la DNasa se eliminaba usando el *DNase inactivator reagent* proporcionado por fabricante y el RNA podía utilizarse en experimentos posteriores.

B. Aislamiento de RNA pequeño. Para la extracción de RNAs pequeños se utilizaba un protocolo de extracción basado en la precipitación diferencial de los ácidos nucleicos con isopropanol. Las células procedentes de un cultivo de 40 ml se recogían y lavaban del mismo modo que para el aislamiento de RNA total. El precipitado celular se resuspendía en 1 ml del reactivo comercial *TRIsure (Bioline)*, se agitaba y se dejaba incubar 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadía 200 μ l de cloroformo, se agitaba, se incubaba 3 minutos a temperatura ambiente y se separaba la fase acuosa centrifugando a 12000 x *g* durante 15 minutos a 4°C. Se recuperaba la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitaban con isopropanol 30% (v/v) centrifugando a 4500 x *g* durante 15 minutos a temperatura ambiente. El precipitado resultante de esta centrifugación, donde están el DNA y RNAs de medio o gran tamaño, se descartaba. Se ajustaba el contenido en isopropanol del sobrenadante al 60% (v/v) y se centrifugaba a 4500 x *g* durante 25 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado obtenido se lavaba con etanol 70% (v/v) y se resuspendía en 30-50 μ l de agua tratada con DEPC.

2.3.2.2.- Determinación de la concentración de RNA

El RNA se cuantificaba midiendo su absorbancia a 260 nm (Sambrook & Russell, 2001) en un espectrofotómetro *Thermo Scientific Genesis 10 UV Scanning*. El coeficiente de extinción molar empleado para determinar la concentración de RNA era $\epsilon = 0.02 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$. En algunos casos, la concentración de RNA se determinaba utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop* modelo *ND-100*.

2.3.2.3.- Electroforesis de RNA en geles de agarosa

Las electroforesis de RNA se hacían en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón MOPS 1X (40 mM MOPS, 10 mM acetato sódico, 1 mM EDTA pH 7.2) con formaldehído al 2% (v/v). Las muestras se preparaban en un volumen final de 20 μ l conteniendo 10 μ g de RNA total ó 2 μ g de RNA pequeño y 15 μ l de tampón de carga (formamida desionizada al 60% [v/v], formaldeído al 6% [v/v], tampón MOPS 1X, azul de bromofenol 0.25% [p/v], xilenecianol FF 0.25% [p/v], bromuro de etidio 0.1% [v/v] y glicerol 10% [v/v]). Las muestras se incubaban 3 minutos a 80°C e inmediatamente se enfriaban en hielo, tras lo cual se sometían a electroforesis a 100 V durante 1-2 horas. Para determinar el tamaño de los fragmentos de RNA, en paralelo con la muestra se cargaba el marcador de RNA comercial *Riboruler High Range RNA Ladder* (si se trataba de RNA total) o el marcador *Riboruler Low Range RNA Ladder* (si eran RNAs pequeños), ambos de la casa comercial *Thermo Scientific*.

2.3.2.4.- Detección de secuencias de RNA mediante hibridación en filtro con sondas radiactivas (Northern blot)

2.3.2.4.1- Transferencia de RNA a filtros de nailon

Tras la separación del RNA en electroforesis (apartado 2.3.2.3), el gel se lavaba tres veces durante 5 minutos con abundante agua desionizada y, posteriormente, se equilibraba con tampón SSC 10X pH 7 (1.5 M NaCl, 150 mM citrato sódico) durante 10 minutos.

A continuación, el RNA se transfería a un filtro de nailon *GeneScreen Plus* (Perkin Elmer) durante 16 horas por capilaridad. Para ello se construía una "pirámide de transferencia" que consistía en poner una plataforma rígida sobre un recipiente que contenía el tampón de transferencia (SSC 10X). Sobre esta plataforma se disponía una hoja larga de papel *Whatman* 3MM previamente empapado en el tampón de transferencia y que permanecía siempre en contacto con dicho tampón. Sobre esta hoja se ponía el gel y, en contacto directo con él, el filtro de nailon. Encima del filtro de nailon se disponían dos papeles de cromatografía *Whatman* 3MM empapados en la solución de transferencia y, sobre ellos, varias capas de papel de filtro seco. Sobre toda esta pirámide se colocaba un peso de aproximadamente 1 Kg para mantener todas las capas en estrecho contacto. De esta manera, al ascender el tampón de transferencia por capilaridad, el RNA se ve arrastrado hacia arriba desde el gel hasta la membrana que está en contacto con él.

Tras las 16 horas de transferencia, el filtro se lavaba brevemente con tampón SSC 2X, se irradiaba 2 minutos con luz UV y se dejaba secar en una estufa a 80°C durante 1-2 horas para fijar el RNA al filtro.

2.3.2.4.2- Hibridación del RNA con sondas radiactivas

Para la hibridación del RNA fijado en el filtro de nailon con sondas de DNA radiactivas se incubaba el filtro en un horno de hibridación a 65°C durante 1-2 horas con solución de prehibridación (0.3 M tampón fosfato pH 6.9, 7% SDS y 1 mM EDTA pH 8). Tras la prehibridación se añadía la sonda de DNA marcada radiactivamente (apartado 2.3.1.9), previamente desnaturalizada a 95°C durante 3 minutos, y se incubaba en el horno de hibridación a 65°C durante 12-16 horas. Tras la hibridación, la membrana se lavaba una vez a 65°C durante 10 minutos con la primera solución de lavado (0.3 M NaCl, 0.03 M citrato trisódico dihidrato, 0.1% SDS) y posteriormente con una segunda solución (0.15 M NaCl, 0.015 M citrato trisódico dihidrato, 0.1% SDS) a 65°C durante 10 minutos.

Como control de la cantidad de RNA cargada en cada calle del gel, los filtros se hibridaban con sondas del gen *trnM*_i que codifica para el tRNA iniciador.

2.3.2.4.3- Detección de la radiactividad

Tanto la detección como el análisis de las señales de hibridación en las membranas se llevaban a cabo mediante autorradiografía electrónica con el sistema *Cyclone Storage Phosphor System* y el programa de análisis de imágenes *Optiquant (Packard)*.

2.3.2.5- RT-PCR

Para los ensayos de RT-PCR se utilizaban 1-5 µg de RNA de *Anabaena* previamente tratado con DNasa I (*Roche*). El RNA se mezclaba, en un volumen final de 15 µl, con 10 pmol de cada oligonucleótido en presencia del tampón de hibridación (150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) y se incubaba 10 minutos a 85°C para desnaturalizar los ácidos nucleicos. A continuación se incubaba durante 1 hora a 50°C (para la transcriptasa reversa *Superscript II, Invitrogen*) o a 55°C (para la transcriptasa reversa *Superscript III, Invitrogen*), lo cual permitía el apareamiento de los oligonucleótidos a su secuencia complementaria en el ARN. Paralelamente se preparaba una mezcla de reacción que contenía 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs, 1/5 del volumen final de tampón *First Strand 5X (Invitrogen)* y se calentaba a 50°C durante 10 minutos antes de añadirlo a la mezcla del RNA con los oligonucleótidos. Inmediatamente antes de añadir la mezcla, se incorporaban 200 U de enzima por reacción y se llevaba a cabo la elongación durante 1 hora a 47 °C para la *Superscript II*, o a 52°C para la *Superscript III*. En paralelo se realizaban reacciones control a las que no se les añadía transcriptasa reversa para poder detectar la presencia de DNA contaminante. Tras la elongación se procedía a inactivar la enzima incubando a 70°C durante 15 minutos para la *Superscript II*, o a 85°C durante 5 minutos para la *Superscript III*. 2 µl de la reacción de retrotranscripción se utilizaban como molde en posteriores reacciones de PCR como se describe en el apartado 2.3.1.6. Los productos de amplificación se resolvían mediante electroforesis en geles de agarosa (apartado 2.3.1.3).

2.3.2.6.- 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

La localización de promotores se llevaba a cabo por el procedimiento de 5'-RACE descrito por Bensing (Bensing *et al.*, 1996). En la figura 2.1 puede observarse un esquema explicativo del procedimiento de 5'-RACE.

5 µg de RNA de *Anabaena* se incubaban durante 30 minutos a 37°C con 20 U de RNA 5' *Polyphosphatase (Epicentre)* y 20 U de *RiboGuard RNase Inhibitor (Epicentre)* en presencia del tampón suministrado por la casa comercial. En paralelo se realizaban reacciones a las que no se añadía RNA 5' *Polyphosphatase*. Tras la incubación, el RNA se extraía con fenol:cloroformo (1:1, [p/v]) y se precipitaba añadiendo 2.5 volúmenes de etanol frío y 0.1 volúmenes de

acetato de sodio 3M pH 5.2, sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido y centrifugando a $16000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C. El precipitado de RNA se lavaba una vez con etanol 70% (v/v) y se resuspendía en 10 µl de agua *milli-Q* autoclavada. A continuación el RNA se ligaba con 15 pmol de un oligonucleótido de RNA (oligonucleótido "RNA-Bensing", Tabla 2.8) mediante la reacción catalizada por la enzima *T4 RNA ligase I* (*New England Biolabs*). Para ello, se incubaban el RNA y el oligonucleótido durante 16 horas a 4°C en presencia de 5 µg de BSA y 80 U de *T4 RNA ligase I* usando el tampón suministrado por el fabricante. Posteriormente, el RNA se extraía de nuevo con fenol:cloroformo (1:1, [p/v]) y se precipitaba con 2 volúmenes de etanol frío, 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido para centrifugarlos a continuación a $16000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C. El RNA precipitado se resuspendía en 12.5 µl de agua *milli-Q* autoclavada y se procedía con la reacción de retrotranscripción. Para ello se utilizaban oligonucleótidos específicos complementarios al RNA de interés. 10 pmoles de cada oligonucleótido se incubaban con 5 µg de RNA en presencia del tampón de hibridación (150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) durante 10 minutos a 85°C para permitir la desnaturalización de los ácidos nucleicos y, a continuación durante 1 hora a 50°C para permitir el apareamiento de los oligonucleótidos con el RNA complementario. La elongación se llevaba a cabo a 47°C durante 1 hora en presencia de 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs, 200 U de transcriptasa reversa *Superscript II* (*Invitrogen*) y 1/5 del volumen final de tampón *First Strand 5X* (*Invitrogen*). Tras la elongación, la transcriptasa reversa se inactivaba incubando 15 minutos a 70°C y el cDNA resultante podía ser usado en una posterior reacción de PCR. Como molde para cada reacción de PCR se utilizaban 2 µl del resultado de la retrotranscripción y como cebadores se utilizaban un oligonucleótido de DNA ("DNA-Bensing") complementario a una porción interna del oligonucleótido "RNA-Bensing" usado anteriormente y un oligonucleótido de orientación contraria que aparee aguas arriba del que se había utilizado como cebador en la reacción de retrotranscripción (Tabla 2.8). Los productos de PCR se resolvían en electroforesis en geles de agarosa y las bandas diferenciales, que sólo aparecían en las muestras tratadas con polifosfatasa, se purificaban (apartado 2.3.1.5) y analizaban mediante secuenciación (apartado 2.3.1.7).

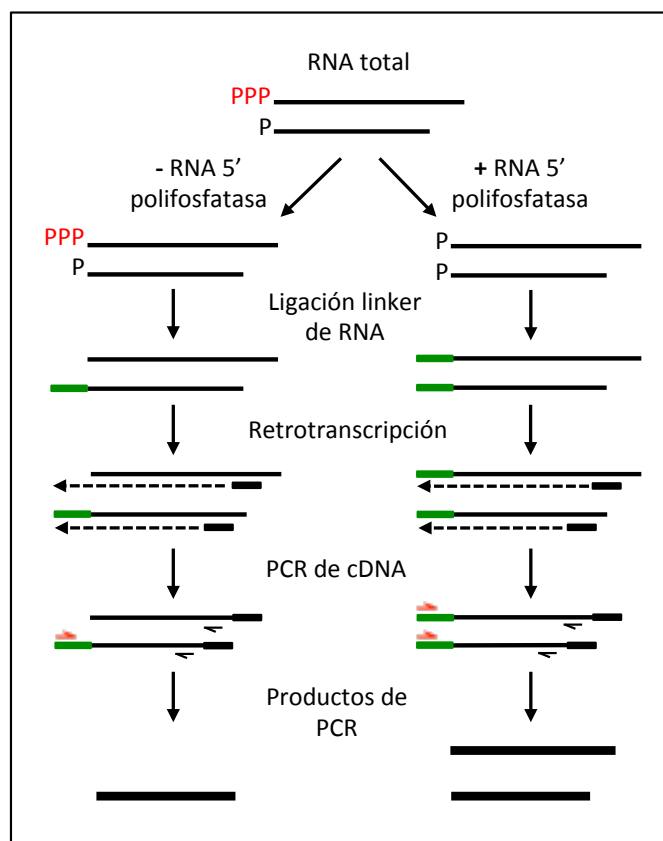


Figura 2.1.- Esquema explicativo de la técnica de 5'-RACE. Técnica que permite distinguir moléculas de RNA con un grupo trifosfato en su extremo 5', que corresponden a inicios de la transcripción, de aquellas moléculas de RNA cuyo extremo 5' contiene un grupo monofosfato, que corresponden a productos del procesamiento de transcritos más largos. Los grupos fosfatos se representan con una "P"; los rectángulos verdes representan el oligonucleótido de RNA; los rectángulos negros representan el cebador que se utiliza para la retrotranscripción; las flechas rojas y negras representan respectivamente los oligonucleótidos *forward* y *reverse* utilizados en la reacción de PCR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
RNA-Bensing	CUAGUACUCCGGUAUUGCGGUACCCUUGUACGCCU GUUUUAUA	Oligonucleótido de RNA utilizado como <i>linker</i> .
DNA-Bensing	GGTATTGCGGTACCCTTGT	Oligonucleótido de DNA complementario a una porción interna del <i>linker</i> "RNA-Bensing".
clusterRT-1	GGCAATTATTAGTTTTTC	Cebador que aparea aguas arriba del primer tRNA del operón <i>trn</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción.
cluster5'RACE-R2	CCAGAATTGTTTCAGCAAATG	Oligonucleótido que aparea aguas arriba del cebador "clusterRT-1". Utilizado en la reacción de PCR junto con el oligonucleótido "DNA-Bensing".
clusterRT-4	GACTTATCTTATTTGTCCAC	Cebador que aparea con secuencias internas del operón <i>trn</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción.
clusterRT-5	ATAGACTGTTTTCGAGAC	Cebador que aparea con

		secuencias internas del operón <i>trn</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción.
cluster5'RACE-R4	GGGATGATGGGATTTGAAC	Oligonucleótido que aparea aguas arriba del cebador "clusterRT-4". Utilizado en la reacción de PCR junto con el oligonucleótido "DNA-Bensing".
cluster5'RACE-R5	GGGATGATGGGATTTGAAC	Oligonucleótido que aparea aguas arriba del cebador "clusterRT-5". Utilizado en la reacción de PCR junto con el oligonucleótido "DNA-Bensing".

Tabla 2.8. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de 5'-RACE. Lista de oligonucleótidos utilizados en los experimentos de 5'-RACE donde se detalla, además de la secuencia nucleotídica, la zona de apareamiento y el propósito del cebador.

2.3.3- Manipulación y análisis de proteínas

2.3.3.1.- Métodos de cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas solubles se empleaba el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se mezclaban un volumen variable de la muestra que se llevaba a un volumen final de 200 μ l con H₂O con 800 μ l de un reactivo de Bradford comercial (*Bio-Rad*) diluido previamente en agua (1:4, v/v). Tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se medía la absorbancia a 595 nm y se determinaba la concentración de proteínas utilizando el coeficiente de extinción molar que previamente se ha determinado mediante una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA.

Para determinar la concentración de proteínas de membrana se utilizaba un método modificado del protocolo de Lowry (Markwell *et al.*, 1978). A cada muestra, en un volumen final de 200 μ l en agua, se le añadían 50 μ l de NaOH 0.5 N y 750 μ l de una disolución C conformada por la mezcla en relación 100:1 de A:B, siendo A (Na₂CO₃ 2% [p/v], NaOH 0.4% [p/v], tartrato sódico-potásico 0.16 % [p/v] y SDS 1% [p/v]) y B (SO₄Cu·5H₂O al 4% [p/v]). Se agitaba con vórtex y se incubaba 5 minutos a 37°C, se añadían 75 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteus (*Merck*) diluido 1:1 en agua y se incubaba de nuevo 5 minutos a 37°C. Finalmente se medía la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro a 750 nm. Para determinar la concentración de proteínas de cada muestra, paralelamente se elaboraba una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA.

2.3.3.2.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación analítica de proteínas se llevaba a cabo mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida según el procedimiento de Laemmli (Laemmli, 1970). El gel de separación se preparaba en tampón Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) y tenía una concentración de acrilamida:bis-acrilamida (30:0.8) del 8-12%, mientras que el gel de empaquetamiento se preparaba en tampón Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) a una concentración de acrilamida:bis-acrilamida (30:0.8) del 4%. Como iniciador de la polimerización se utilizaba persulfato amónico (APS) 0.05% (p/v) y como catalizador se usaba N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) al 0.1% (v/v). Ambos geles contenían SDS a concentración final de 0.1% (p/v).

Las muestras de proteínas se preparaban en un volumen máximo de 20 μ L de los que la cuarta parte correspondían al tampón de carga (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol [v/v], 2.5% SDS [p/v], 5% 2-mercaptoetanol [v/v] y 0.0025% de azul de bromofenol [p/v]). Antes de ser cargadas en el gel, las muestras se hervían a 100°C durante 3 minutos. Como patrón de tamaño se utilizaba el marcador de peso molecular *Page Ruler™ Unstained Protein Ladder* (Thermo Scientific). La electroforesis se realizaba usando tampón de SDS-PAGE (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina y 0,1% SDS [p/v]) y se utilizaban aparatos *Miniprotean II* o *Miniprotean III* (Bio-Rad). El gel se resolvía a un voltaje constante de 200 V durante aproximadamente 50 minutos. Posteriormente, el gel se visualizaba utilizando una solución que contenía 0.5% de azul de Coomassie R-250 (Sigma), 10% ácido acético (v/v) y 40% metanol (v/v).

2.3.3.3.- CN-native

Para los ensayos de CN-native se partía de cultivos de 700 ml de *Anabaena* crecidos en medio BG11 libre de cobre a una temperatura de 30°C, iluminación continua de 75 μ E·m⁻²·s⁻¹ y burbujeo constante con una mezcla de aire y CO₂ al 1% (v/v). Para inducir la producción de proteínas cuya expresión estaba controlada por el promotor inducible por cobre (*PpetE*), se añadía al cultivo CuSO₄ a una concentración final de 1.5 μ M cuando éste alcanzaba una concentración de clorofila de 4-5 μ g/ml y se cultivaba en las mismas condiciones durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los cultivos se recogían y se fraccionaban según (Kopečna *et al.*, 2012). Las células se recogían por filtración, se lavaban dos veces con *thylakoid buffer* (25 mM MES-NaOH pH 6.5, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 20% glicerol) y se resuspendían en *thylakoid buffer* a razón de 5 ml/g peso fresco. A continuación se añadía inhibidor de proteasas (*complete EDTA free*, Roche) y se rompían las células haciéndolas pasar tres veces por la prensa de French a 9000 psi. El extracto celular obtenido se centrifugaba a 20000 x *g* durante

15 min a 4°C para separar la fracción soluble (sobrenadante), que se descartaba, de la fracción de membrana (*precipitado*). El *precipitado* se resuspendía en 1 ml de *thylakoid buffer*, se medía su concentración de clorofila y se le añadía digitonina (*Sigma*) a una relación de 10 g digitonina/g clorofila. Las membranas se dejaban solubilizar a 4°C durante 30 minutos con agitación suave, tras lo cual se centrifugaban a 20000 x *g* durante 15 minutos a 4°C para eliminar el material insoluble y se almacenaban las muestras a -20°C hasta el momento de someterlas a electroforesis bidimensional.

La primera dimensión de la electroforesis bidimensional se llevaba a cabo en condiciones no desnaturizantes, para lo cual se preparaba un gel nativo en gradiente de poli(acrilamida) del 3% al 13% (p/v). Las soluciones para elaborar el gel se preparaban a partir de un *stock* al 40% (p/v) de acrilamida y bis-acrilamida a razón 29:1 (p/p) en el tampón de geles nativos (0.05 M Bis-Tris y 0.2 M de ácido 6-aminohexanoico). A cada solución de acrilamida se añadía digitonina al 0.005% (p/v) para favorecer la entrada de la muestra en el gel (Krause & Seelert, 2008). Para la polimerización del gel se añadía APS y TEMED a concentración final de 0.05% (p/v). Los geles se guardaban a 4°C hasta su uso. A continuación, se cargaba el volumen de muestra correspondiente a 5 µg de clorofila en el gel nativo. Como indicador de avance de la migración se cargaba 20 µl de rojo Ponceau 0.1% (p/v) en un pocillo. Una vez cargadas las muestras, se llevaba a cabo la electroforesis en un tanque de electroforesis *Miniprotean III* (*Bio-Rad*) con un sistema de tampones consistente en 50 mM Bis-Tris pH 7 para el ánodo; y 15 mM Bis-Tris pH 7, 50 mM tricina para el cátodo. La migración se realizaba a una temperatura de 4°C con un voltaje constante de 100 V hasta que el rojo Ponceau hubiera migrado 1 cm en el gel. En ese momento se aumentaba el voltaje hasta los 250 V y se dejaba migrar a 4°C hasta que el rojo Ponceau llegaba al final del gel.

A continuación se procedía con la segunda dimensión de la electroforesis en condiciones desnaturizantes. Para ello se recortaban tiras correspondientes a cada calle del gel de la primera dimensión y se incubaban durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución desnaturizante compuesta por SDS 2% (p/v), 66 mM Na₂CO₃ y β-mercaptoetanol 0.67% (v/v). Tras ello, se depositaba la tira en posición horizontal sobre un gel desnaturizante en gradiente de poli(acrilamida) del 8% al 20% (p/v) con SDS 0.1% (p/v). Como patrón de tamaño se utilizaba el marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (*Fermentas*). La electroforesis se llevaba a cabo en aparatos *Miniprotean III* con un tampón 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina y 0.1% SDS (p/v). El gel se resolvía con una corriente constante de 50 mA durante 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las proteínas del gel se visualizaban mediante tinción con azul Coomassie incubando el gel durante 15 minutos en una

solución que contenía 0.5% (p/v) de azul Comassie R-250 (*Sigma*), 10% ácido acético (v/v) y 40 % metanol.

2.3.3.4.- *Cross-linking in vivo* y purificación de proteínas

Para los experimentos de *cross-linking in vivo* se utilizaban cultivos de *Anabaena* de 80 ml en medio BG11 (o medio BG11 libre de cobre) crecidos a 30°C con iluminación continua de intensidad $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y burbujeo constante con una mezcla de aire y CO₂ al 1% (v/v). Los cultivos de estirpes mutantes en las que la producción de las proteínas de interés estaba controlada por el promotor inducible por cobre (*PpetE*) se cultivaban en esas condiciones hasta alcanzar una concentración de clorofila de 4-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. En ese momento se añadía al medio de cultivo CuSO₄ a concentración final 1.5 μM para inducir la expresión del promotor *PpetE*. Los cultivos se dejaban entonces 24 horas creciendo en condiciones estándar y se procedía al *cross-linking in vivo* mediante tratamiento con formaldehído (agente que fija las interacciones entre moléculas cercanas) tal como describen Staron y colaboradores (Staron *et al.*, 2011). Para ello, a los cultivos se añadía 11.4 ml de la solución de *cross-linking* (4% formaldehído (v/v), 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl y 2.7 mM KCl) hasta obtener una concentración final de formaldehído de 0.5% y se incubaban durante 20 minutos a temperatura ambiente con luz continua de intensidad $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y burbujeo.

Las células de 80 ml de cultivo se recogían por centrifugación a 4500 x g durante 5 minutos a 4°C y se lavaban 2 veces con 100 mM Tris-HCl pH 8. El *precipitado* obtenido se resuspendía en 100 mM Tris-HCl pH 8 a razón de 2 ml/g peso fresco, se añadía inhibidor de proteasas (*Complete EDTA free*, Roche) y las células se rompían haciéndolas pasar 10 veces por la prensa de French a 18000 psi, obteniéndose un extracto celular (extracto total). Posteriormente se procedía al fraccionamiento celular del extracto obtenido, para lo cual se centrifugaba a 32000 x g durante 15 minutos a 4°C con objeto de eliminar las células sin romper. El sobrenadante obtenido se ultracentrifugaba a 100000 x g durante 1h a 4°C para separar la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción de membrana (*precipitado*). Para evitar contaminación cruzada entre las fracciones, se recuperaba únicamente 3/4 del volumen de sobrenadante, evitando recuperar el volumen de sobrenadante en contacto con el *precipitado*. El *precipitado* se lavaba 3 veces con 100 mM Tris-HCl pH 8 y se resuspendía en 500 μl de tampón de lisis (150 mM NaCl, 1% [v/v] Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8 y 10% [v/v] glicerol). Las membranas se dejaban solubilizar incubando en este tampón durante 30 min a 4°C con agitación suave, tras lo cual se centrifugaban a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C para eliminar las partículas insolubles.

Posteriormente se determinaba el contenido en proteínas de las diferentes fracciones mediante el método de Lowry (apartado 2.3.3.1). 7 mg de proteína total se incubaban con anticuerpos acoplados a partículas magnéticas (*anti-tag MicroBeads, Miltenyi*) a razón de 50 μ l anticuerpo/ml extracto durante 1 hora a 4°C con agitación suave. Finalmente se llevaba a cabo la purificación de proteínas mediante inmunoprecipitación haciendo uso del juego de reactivos μ MACs *Epitope Tag (Miltenyi)* y siguiendo las indicaciones del fabricante. El *cross-linking* se revertía en el paso de elución mediante la incubación con el tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 50 mM DTT, 1% [p/v] SDS, 1 mM EDTA y 0.005% [p/v] de azul de bromofenol) precalentado a 95°C. El resultado de la elución se resolvía mediante SDS-PAGE en un gel desnaturalizante en gradiente de poliacrilamida del 8% al 15% (p/v) usando como patrón de tamaño el marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)*. Las proteínas del gel se visualizaban mediante tinción con azul Comassie incubando el gel durante 15 minutos en una solución que contenía 0.5% (p/v) de azul Comassie R-250 (*Sigma*), 10% ácido acético (v/v) y 40 % metanol.

2.3.3.5.- Inmunodetección de proteínas (Western blot)

Para la inmunodetección de proteínas, en primer lugar se sometían las proteínas de interés a electroforesis tal y como se describe en el apartado 2.3.3.2 usando como patrón de peso molecular el marcador preteñido *PageRuler Prestained Protein Marker (Thermo Scientific)*. Tras la electroforesis, las proteínas del gel se transferían a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) *Hybond P (GE Healthcare)* utilizando el sistema de transferencia *TE77 Semi-Dry Transfer Unit (GE Healthcare)*. Previo al proceso de transferencia, se preparaban para cada gel 6 piezas de papel *Whatman* 3MM y una membrana de PVDF de las mismas dimensiones del gel a transferir. Con el objetivo de preparar la membrana para la transferencia, ésta se sumergía durante varios segundos en metanol y posteriormente durante 15 minutos en agua desionizada, mientras que dos de los 6 papeles *Whatman* se sumergían en tampón ánodo 1 (Tris 75 mM pH 10,4, metanol 20% [v/v]), uno se sumergía en tampón ánodo 2 (Tris 6,32 mM pH 10.4, metanol 20% [v/v]) y 3 hojas se sumergían en tampón cátodo (SDS 3.46 mM, Tris 6,23 mM pH 9-4, metanol 20% [v/v]). Para la transferencia se disponían los diferentes elementos en el siguiente orden de abajo a arriba: dos hojas de papel *Whatman* humedecidas en tampón ánodo 1, una hoja empapada en tampón ánodo 2, la membrana de PVDF empapada en tampón ánodo 2, el gel de poliacrilamida a transferir y las tres hojas de papel *Whatman* humedecidas con tampón cátodo. La transferencia se llevaba a cabo durante 1-2 horas con una intensidad de corriente continua que se calculaba multiplicando la superficie (en cm²) por un factor de 0,8. Tras la transferencia, el gel se teñía con azul Coomassie para

comprobar que toda la proteína se había transferido a la membrana, mientras que la membrana se lavaba brevemente con agua desionizada y se incubaba en solución de bloqueo (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 % [p/v] leche en polvo desnatada y 0.05% [v/v] Igepal) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital. Posteriormente la membrana se incubaba en una solución que contenía 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2% (p/v) leche en polvo desnatada, 0.25% (v/v) Tritón X-100 y el anticuerpo primario diluido a razón 1:2000 (para el anticuerpo anti-GFP, *Invitrogen*) o 1:2500 (para el anticuerpo *Penta-His HRP-conjugate, Qiagen*). La membrana se incubaba en esta solución durante 1 hora a 37°C con agitación orbital o, alternativamente, durante 16 horas a 4°C con agitación orbital. Tras ello, la membrana se lavaba 3 veces durante 5 minutos con tampón TBS suplementado con 0.05% Tween-20 y una vez durante 15 minutos con agua desionizada. Cuando se usaba el anticuerpo anti-GFP, el cual no estaba acoplado a la enzima peroxidasa de rábano, era necesario llevar a cabo una segunda incubación de la membrana con el anticuerpo secundario *Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Conjugate (BioRad)* diluido 1:3000 en una solución compuesta por 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2% (p/v) leche en polvo desnatada y 0.25% (v/v) Tritón X-100. Esta incubación tenía lugar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital, tras lo cual se lavaba la membrana 4 veces durante 5 minutos con tampón TBS suplementado con 0.05% Tween-20 y una vez durante 15 minutos con agua desionizada. Para el revelado de la membrana se empleaba el juego de reactivos *WesternBright ECL Western blotting detection kit (Advansta)* siguiendo las instrucciones del fabricante. La visualización de la señal se llevaba a cabo exponiendo la membrana en un aparato de captación de imágenes *ChemiDoc XRS+ (BioRad)* durante un tiempo variable entre 1-5 minutos.

2.3.4.- Otras técnicas analíticas

2.3.4.1.-Determinación del contenido en pigmentos fotosintéticos

2.3.4.1.1.-Determinación del contenido en clorofila

El contenido celular en clorofila se determinaba en extractos metanólicos (Mackinney, 1941) Las células de 1 ml de cultivo se recogían por centrifugación. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendía en 1 ml de metanol y se agitaba durante 1 minuto en el vórtex. Tras centrifugar 1 minuto a 13000 x *g* se medía la absorbancia del sobrenadante a 665 nm. La concentración de clorofila se calculaba usando un coeficiente de extinción $\epsilon=74,46 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.3.4.1.2.-Determinación del contenido en ficobiliproteínas

El contenido en ficobiliproteínas se estimaba por un procedimiento basado en el descrito por Glazer (Glazer, 1976). Para ello, las células de 50 ml de un cultivo con un contenido en clorofila comprendido entre 3 y 9 $\mu\text{g/ml}$ se filtraban a través de filtros *Millipore* HA 0,45 μM y se lavaban con abundante agua ultrapura. Tras resuspender en 5 ml de agua ultrapura, se sonicaba la suspensión celular durante 1.5 minutos en un sonicador *Branson* modelo *Digital Sonifier 250* usando la punta gruesa con una amplitud del 50 %, y alternando periodos de actividad de 30 segundos con periodos de reposo de del mismo tiempo. El extracto se diluía en agua a razón 1:5 y se centrifugaba a 15000 x *g*, 4°C durante 1 minuto. La concentración de ficobiliproteínas se calculaba según la absorbancia de la muestra a 620 nm usando un coeficiente de extinción $\epsilon=7,41 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{ml}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.3.4.1.3.-Determinación del contenido en carotenoides

Para determinar el contenido en carotenoides se usaba un procedimiento basado en el descrito por Davies (Davies, 1976). Tras preparar extractos de *Anabaena* del modo que se describe en el apartado anterior se mezclaban 200 μl del extracto con 800 μl de acetona y se mezclaba con vórtex. La mezcla se centrifugaba a 15000 x *g* durante 1 minuto a 4°C y se medía la absorbancia del sobrenadante a 465, 480 y 663 nm. El contenido en carotenoides se calculaba aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Abs}(480) \text{ carotenoides} = \text{Abs}(480) + 0.114 \cdot \text{Abs}(663) - 0.638 \cdot \text{Abs}(465)$$

$$\text{Conc. carotenoides (mg}\cdot\text{ml}^{-1}) = \text{Abs}(480) \text{ carotenoides} / \epsilon \cdot l$$

$$\epsilon = 250 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{ml}\cdot\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}$$

2.3.4.2.-Ensayos de aminoacilación de tRNA

Los ensayos *in vitro* para medir la actividad de aminoacilación de la valil-tRNA sintetasa se realizaban como describen Francklyn y colaboradores (Francklyn *et al.*, 2008). La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 25 μl a una temperatura de 30°C y con agitación constante de 300 rpm en un agitador termostatzado *Thermo-Shaker TS-100C* (*bioSan*). La mezcla de reacción contenía 100 mM HEPES pH 7.5, 20 mM KCl, 30 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 0.5 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 20 μM [^{14}C]-L-Val (250 Ci/mol), 10 μM tRNA^{Val} y 5-15 nM de enzima.

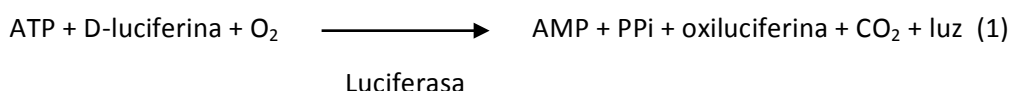
A distintos tiempos (generalmente 2, 4 y 8 minutos) se tomaban alícuotas de 22 μl y se detenía la reacción depositando la alícuota sobre filtros *Whatman* de celulosa de 0.11 μm (*GE Healthcare*) previamente sumergidos en ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v). El ácido tricloroacético provoca que el aminoacil-tRNA (valil-tRNA en este caso) precipite y quede fijado

al filtro. Tras la precipitación, se dejaban secar los filtros bajo una lámpara incandescente y se lavaban 3 veces con TCA 5% (p/v) durante 5 minutos en agitación. Tras el último lavado, se sumergían los filtros en etanol absoluto y se secaban bajo una lámpara incandescente. Una vez secos, los filtros se sumergían en líquido de centelleo EcoLite+ (*MP Biomedicals*) y se cuantificaba la radiactividad en un contador de centelleo *LS 6500* (*Beckman*) en el que se determinaba las desintegraciones por minuto (DPM) del isótopo radiactivo ^{14}C .

Todos los ensayos se complementaban con reacciones control que se procesaban de igual manera que el resto de muestras del ensayo pero que carecían de tRNA. Dos alícuotas de 22 μl (*washed*) se lavaban con TCA 5% (p/v) y se determinaba el valor basal de radiactividad que se adhiere al filtro, el cual se restaba al valor de DPM de las muestras del ensayo. A otras dos alícuotas de 22 μl (*unwashed*) se les determinaba el valor de DPM directamente sin sufrir ningún proceso de lavado, de lo que se podía determinar con precisión la cantidad de radiactividad utilizada en el ensayo.

2.3.4.3.-Medida de la concentración intracelular de ATP

Los ensayos que permitieron determinar la concentración intracelular de ATP se llevaron a cabo haciendo uso del juego de reactivos *ATP Biomass Kit HS* (*BioThema*) basado en la emisión de luz por actividad luciferasa, la cual es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la reacción (1).



0.1 ng de clorofila de cultivos de *Anabaena* y del mutante DR10 creciendo en condiciones estándar o incubados durante 4 horas con MSX se mezclaban con 50 μl del reactivo comercial *Extractant B/S*, el cual liberaba el ATP contenido en las células del cultivo. A continuación se añadían 400 μl del reactivo *ATP Reagent HS*, que contenía la D-luciferina y la luciferasa, y la emisión de luz se medía con un contador de centelleo *Beckman* modelo *LS 6000*. En paralelo se realizaba una recta patrón con cantidades conocidas de ATP de manera que se podía relacionar las unidades arbitrarias (UA) arrojadas por el contador de centelleo con la cantidad de ATP en la muestra.

2.3.4.4.-Métodos de microscopía

2.3.4.4.1.-Microscopía confocal

Para la detección de la proteína verde fluorescente (GFP), las muestras se visualizaron usando un objetivo de inmersión HCX PLAM-APO 63x 1.4 NA en un microscopio *Leica* modelo TCS SP2. La proteína GFP se excitaba a 488 nm gracias a la acción de un láser de argón y la fluorescencia emitida se monitorizaba en el rango de 500-540 nm. La fluorescencia inherente a los pigmentos cianobacterianos (autofluorescencia) se monitorizaba en el rango de 630-700 nm. Las muestras analizadas se disponían en medio sólido con el objetivo de visualizar todos los filamentos en el mismo plano. El tratamiento de las imágenes obtenidas se llevó a cabo con el software *ImageJ* v 1.41.

Para los experimentos de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP, *Fluorescence Recovery After Photobleaching*), se partía de un cultivo en condiciones diazotróficas durante 24 horas de células de una estirpe de *Anabaena* que expresa la proteína de fusión GFP-CAAD bajo el promotor del gen *patS*. Transcurrido este tiempo, se sembraba una muestra del cultivo en medio BG11₀ sólido (medio carente de fuente de nitrógeno). Las células creciendo en medio sólido se disponían en una cámara incubadora que mantenía las células a 30°C durante todo el experimento. Tras tomar una imagen previa, se procedía con el fotoblanqueo cambiando el modo de exploración del microscopio a Xt, excitando la proteína GFP a 488 nm con un aumento en un factor de 8x en la potencia del láser de argón y escaneando una sección de la célula durante 0.137 segundos. A continuación se reducía la intensidad del láser, se cambiaba el modo de exploración del microscopio a XY y se analizaba la recuperación de la fluorescencia monitorizando la emisión en el rango de 500-540 nm (para GFP) y 630-700 (para los ficobilisomas) y capturando instantáneas cada cierto intervalo de tiempo (típicamente cada 5 segundos o cada minuto). Las imágenes obtenidas se analizaron con el software *ImageJ* v 1.41.

2.3.4.4.2.-Microscopía de fluorescencia

Para visualizar la proteína GFP se utilizó un microscopio de fluorescencia *Leica* DM6000B con un objetivo 100x o 63x. La fluorescencia de la GFP se detectó usando un filtro FITC L5 con un rango de excitación de 480/40 nm y un rango de emisión de 572/30 nm. La autofluorescencia se detectó usando un filtro Texas Red TX2 con una ventana de excitación de 560/40 nm y un rango de emisión de 645/75 nm. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software *LAS AF Leica*.

2.3.4.4.3-Cálculo del coeficiente de difusión

Partiendo de las imágenes obtenidas en los experimentos de FRAP (apartado 2.3.4.4.1), se llevó a cabo una cuantificación de la fluorescencia de la zona fotoblanqueada con el tiempo haciendo uso del software *ImageJ* v 1.41. La recuperación de la fluorescencia se ajusta a una curva exponencial, por lo que para el cálculo del coeficiente de difusión se empleó la siguiente función exponencial (Merino-Puerto *et al.*, 2001b):

$$C_B = C_0 + C_R (1 - e^{-Rt}) \quad (2)$$

Donde C_B es la fluorescencia total, C_0 es la fluorescencia inmediatamente después del fotoblanqueado, C_R es la fluorescencia recuperada, R es el coeficiente de difusión y t es el tiempo. Para calcular el coeficiente de difusión se utilizó el software *SigmaPlot*, que ajusta los datos a una curva exponencial dada por la ecuación (2) asignando valores arbitrarios de R hasta obtener la curva que mejor se ajusta a los datos experimentales.

2.3.4.5.-Aislamiento y análisis de polisomas

2.3.4.5.1.-Aislamiento de polisomas

a) Cultivo y recogida de células

Para el aislamiento de polisomas se empleaba un protocolo modificado del método de Qin y Fredrick (Qin & Fredrick, 2012). Cultivos de 300 ml de *Anabaena* en fase exponencial tratados durante 24 horas con metil viológeno a concentración final de 0.2 μ M, se incubaban con 500 μ g/ml de cloranfenicol durante 3 minutos y las células se recogían mediante filtración con filtros de nitrocelulosa como se describe en el apartado 2.1.1.3. A continuación las células se lavaban con tampón T₅₀E₁₀₀ frío (50 mM Tris-HCl pH 7,5 y 100 mM EDTA pH 8) y se congelaban rápidamente en nitrógeno líquido.

b) Preparación del lisado celular

Los precipitados de células se resuspendían en 500 μ l de tampón de lisis frío (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂ y 1 mg/ml lisozima) y se incubaban en este tampón durante 15 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, se sumergían las muestras en nitrógeno líquido y se dejaban descongelar en hielo agitando las muestras ocasionalmente. Una vez descongeladas, se volvían a sumergir en nitrógeno líquido para repetir el proceso de congelación-descongelación. A continuación, para completar la lisis celular, se añadía a la muestra 15 μ l de deoxicolato de sodio 10% (p/v) y se mezclaba invirtiendo el tubo suavemente. Finalmente, con objeto de eliminar los restos celulares, se centrifugaban las

muestras a $12000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . El precipitado obtenido se desechaba y se recuperaba el sobrenadante que podía congelarse a -80°C añadiendo glicerol 15% (v/v) o podía utilizarse directamente para su separación en un gradiente de sacarosa.

c) Preparación de los gradientes de sacarosa

Para generar los gradientes de sacarosa se preparaban dos soluciones con la composición que se indica en la tabla 2.9 conteniendo la concentración de sacarosa deseada como límites del gradiente. En este trabajo se han generado gradientes continuos de sacarosa del 7%-50% por lo que se preparaba una solución al 7% (p/v) y otra al 50% (p/v), (Tabla 2.9). Cada gradiente tenía un volumen de 11.2 ml por lo que se utilizaban 5.6 ml de cada tampón de sacarosa por gradiente.

Para la obtención del gradiente se empleaba un formador de gradientes, dispositivo que consiste en dos recipientes abiertos conectados por la base mediante un tubo (Figura 2.2). En el recipiente más cercano a la salida se colocaba la solución menos concentrada mientras que en el más alejado se añadía la solución más concentrada en sacarosa. A medida que la bomba peristáltica extraía líquido a través de la válvula de salida, el volumen desalojado era reemplazado por la solución más concentrada en sacarosa que, al mezclarse por el movimiento de una barra magnética, modifica linealmente la concentración de sacarosa saliente generando así el gradiente continuo.

Componente	Concentración final (tampón de sacarosa al 7%)	Concentración final (tampón de sacarosa al 50%)
Tris-HCl, pH 7.8	20 mM	20 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
NH ₄ Cl	100 mM	100 mM
DTT	2 mM	2 mM
Sacarosa	7%	50%

Tabla 2.9. Composición de los tampones empleados para elaborar los gradientes de sacarosa. Tabla donde se detalla los elementos que forman parte de los tampones necesarios para preparar los gradientes de sacarosa, así como la concentración final de cada uno de ellos.

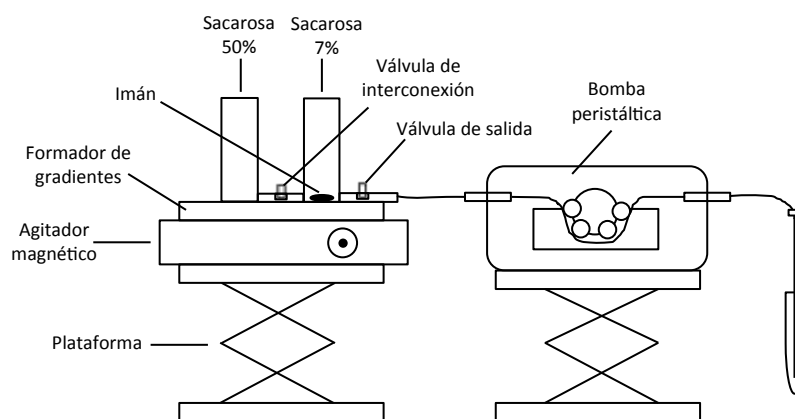


Figura 2.2.- Esquema del montaje empleado para la formación de gradientes de sacarosa.

d) Separación de las muestras en gradientes de sacarosa

Los gradientes se preparaban en tubos de ultracentrífuga SW-41 de 14 x 89 mm (*Beckman Coulter*). Una vez aplicada la muestra en la parte superior del gradiente se centrifugaba a 35000 rpm durante 3 horas a 4°C en un rotor SW-41 Ti (*Beckman*). Durante la centrifugación los diferentes componentes celulares se desplazan a lo largo del gradiente de sacarosa hasta alcanzar la franja en que su densidad es igual a la de la solución de sacarosa circundante. De esta manera las partículas menos densas permanecerán en la zona del gradiente con menos concentración de sacarosa (en la parte alta del tubo) mientras que las partículas más densas, entre las que están los polisomas, se encontrarán en la zona baja del tubo con mayor densidad.

e) Fraccionamiento de los gradientes de sacarosa

Para separar las distintas fracciones resultantes de la centrifugación del gradiente de sacarosa se empleaba un fraccionador ISCO UA-6. Mediante una bomba peristáltica se bombeaba a un flujo de 1 ml/min una solución de sacarosa al 60% por debajo del tubo SW-41 en el que estaba la muestra separada previamente por centrifugación. La solución de sacarosa al 60% empujaba el gradiente hasta un lector ultravioleta que registraba de forma continua la absorbancia de la muestra a 254 nm. A medida que salía la muestra, se recogían fracciones de 0.5 ml que eran rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su análisis.

2.3.4.5.2.-Análisis de polisomas**a) Extracción de RNA de las fracciones polisómicas**

El RNA de las fracciones polisómicas (aproximadamente 8 ml) se extraía con fenol:cloroformo (1:1, [v:v]) agitando vigorosamente y centrifugando a 4500 x g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente el RNA contenido en la fase acuosa se precipitaba añadiendo 1.5 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y centrifugando a 8000 x g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendía en 1 ml de agua tratada con DEPC y se volvía a precipitar el RNA con 1.5 volúmenes de etanol centrifugando a 13000 x g durante 25 minutos a 4°C. Finalmente, se lavaba el precipitado obtenido con etanol al 70% (v/v), se dejaba secar y se resuspendía en 40 µl de agua tratada con DEPC para realizar un tratamiento con 10 unidades de DNasa I-turbo (*Ambion*) en el tampón suministrado por el fabricante.

b) Análisis del RNA de las fracciones polisómicas por RT-PCR

El análisis del RNA presente en las fracciones polisómicas se llevaba a cabo mediante RT-PCR. 1 µg del RNA extraído de las fracciones polisómicas y, en paralelo, 1 µg de RNA total se sometían a retrotranscripción y posterior amplificación del cDNA por PCR como se describe en el apartado 2.3.2.5 para la transcriptasa reversa *Superscript III* (Invitrogen). Los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR se detallan en la tabla 2.10.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
tRNA ^{Lys} -RT	TGGTGGGGTATACAGGAG	Oligonucleótido que aparea en el extremo 3' del gen <i>trnK-UUU</i> (2). Empleado durante la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{LysUUU(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Lys} -1F	TATTGGCATAGCGGCAAG	Pareja de cebadores utilizada para amplificar por PCR el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnK-UUU</i> (2)
tRNA ^{Lys} -2R	AGTCGAACCTGTCTAAGTCG	
tRNA ^{Val} -RT	TGGTAGCCCTGACAGGA	Oligonucleótido que aparea en el extremo 3' del gen <i>trnV-UAC</i> (2). Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{ValUAC(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Val} -1F	AGCCCTGTAACCTCAATTGGT	Pareja de cebadores utilizada para amplificar por PCR el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnV-UAC</i> (2)
tRNA ^{Val} -2R	CAGGATTGAACCCGCTAC	
tRNA ^{Glu} -TTC-RT	CAGTGCAGACGGGAC	Oligonucleótido que aparea en el extremo 3' del gen <i>trnE-UUC</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{GluUUC} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Glu} -TTC-1F	GGTGCAGAAGCGAAGTGGTC	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnE-UUC</i> .
tRNA ^{Glu} -TTC-1R	GACTCGAACCCGCTAATTACAC	
tRNA ^{Ala} -RT	TGGAATCAAGGGGATTT	Oligonucleótido que aparea en el extremo 3' del gen <i>trnA-UGC</i> (5). Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{AlaUGC(5)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Ala} -1F	GGGGTCATAGCTCAACTGGC	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnA-UGC</i> (5)
tRNA ^{Ala} -2R	TTTGAACCCCTAACCTCCC	
tRNA ^{Leu} -CAA-RT	TGGTACTCCTGATGGGAT	Oligonucleótido que aparea en el extremo 3' del gen <i>trnL-CAA</i> (2). Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{LeuCAA(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Leu} -CAA-1F	ACTCCTGTAGCCCAATTGGC	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnL-CAA</i> (2)
tRNA ^{Leu} -CAA-1R	GGATTGAACCCATACACAG	
tRNA ^{Leu} -TAG-RT	CTTGACAGGAGTTGAACC	Oligonucleótido que aparea en el extremo 3' del gen <i>trnL-UAG</i> (2).

		Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{LeuUAG(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Leu} -TAG-1F	CCTTGTGACGCAATTGGC	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnL-UAG(2)</i> .
tRNA ^{Leu} -TAG-1R	GAACCTGCAACAAACCCGG	
tRNA ^{Leu} -TAA-RT	TACCCTGACAGGATTT	Oligonucleótido que aparee en el extremo 3' del gen <i>trnL-UAA(2)</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{LeuUAA(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Leu} 3-1F	ACCCCTGTGATGCAATTGGC	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnL-UAA(2)</i> .
tRNA ^{Leu} -TAA-1R	GGATTGTAACCTGTAGAAAACCCG	
tRNA ^{Arg} -ACG-RT	CGAGAACGGAGGGAC	Oligonucleótido que aparee en el extremo 3' del gen <i>trnR-ACG(2)</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{ArgACG(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Arg} -ACG-1F	GAGAACGTGGTGTAAGTGGATT	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnR-ACG(2)</i> .
tRNA ^{Arg} -ACG-1R	GGACTTGAACCCCAACC	
tRNA ^{Ser} -CGA-RT	CACACAGGAATTGAACCT	Oligonucleótido que aparee en el extremo 3' del gen <i>trnS-CGA(2)</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{SerCGA(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Ser} -CGA-1F	CCAGGTCGCCTAATGGTAAG	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnS-CGA(2)</i> .
tRNA ^{Ser} -CGA-1R	GGAATTGAACCTGCATAGACT	
tRNA ^{Gln} -TTG-RT	GGGAAGGCAGGAATC	Oligonucleótido que aparee en el extremo 3' del gen <i>trnQ-UUG(2)</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{GlnUUG(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Gln} -TTG-1F	GGAAGTAGGCGACGTTGGC	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnQ-UUG(2)</i> .
tRNA ^{Gln} -TTG-1R	GGAATCGAACCCGCGAG	
tRNA ^{Thr} -TGT-RT	AGCTGGTGACAGGAGTT	Oligonucleótido que aparee en el extremo 3' del gen <i>trnT-UGU(2)</i> . Utilizado en la reacción de retrotranscripción del gen que codifica para el tRNA ^{ThrUGU(2)} del plásmido delta de <i>Anabaena</i> .
tRNA ^{Thr} -TGT-1F	CTGGTGTGGCTCAACGGC	Pareja de cebadores utilizada en la PCR que amplifica el cDNA resultante de la retrotranscripción del gen <i>trnT-UGU(2)</i> .
tRNA ^{Thr} -TGT-1R	GGAGTTGAACCCGCAACCG	

Tabla 2.10. Oligonucleótidos empleados para el análisis de polisomas mediante RT-PCR. Listado de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR de fracciones polisómicas. Se detalla la secuencia nucleotídica, la zona de apareamiento y el propósito del cebador.

2.3.4.6.- Espectrometría de masas

Para la determinación de la identidad de proteínas mediante espectrometría de masas se hizo uso del servicio externo de Proteómica de la Universidad de Alicante en colaboración con los Dres. Roque Bru y Susana Sellés.

2.3.4.7.- Análisis bioinformático

Para el manejo rutinario de secuencias de DNA (búsqueda de pautas de lectura abiertas, localización de dianas de restricción y la traducción de secuencias nucleotídicas a secuencias de aminoácidos) se utilizaba el programa *DNA Strider* diseñado por C. Mark (*Service de Biochimie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, Francia*).

La secuencia del genoma completo de *Anabaena sp.* PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001) se encuentra disponible en la base de datos *Cyanobase* (<http://bacteria.kazusa.org.jp/cyanobase/>), la cual se utilizó para consultar secuencias de ORFs así como los contextos genómicos de dichas ORFs.

Para el diseño de oligonucleótidos para las reacciones de PCR y retrotranscripción, se utilizó la herramienta de diseño *Oligo Calculator* (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligo-evaluator.html>), del *Web Toolbox* de Sigma.

Para el alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoácidas se empleó el programa CLUSTALW2 (Chenna *et al.*, 2003) proporcionado por el *European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)* así como la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) proporcionada por el *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

Para la identificación de tRNAs y el análisis de su estructura se emplearon los *software* tRNAscan-SE 1.21 (Schattner *et al.*, 2005) y ARAGORN (Laslett & Canback, 2004).

El árbol filogenético de especies de cianobacterias ha sido realizado por el Dr. Jesús Ochoa de Alda tal y como se describe en (Santamaría-Gómez *et al.*, 2016).

3

CAPÍTULO I

**Las aaRSs de cianobacterias: localización subcelular y
formación de complejos**

3.1 RESULTADOS

Las aaRSs de cianobacterias: localización subcelular y formación de complejos

3.1.1.- Detección del dominio CAAD en nuevas aaRSs. Distribución de aaRS^C en el árbol de especies de cianobacterias

Estudios previos del grupo revelaron que 14 genomas de cianobacterias codificaban aaRSs que contenían el dominio CAAD (Luque *et al.*, 2008; Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Este dominio se encontró en cuatro aaRSs distintas: GluRS, ValRS, IleRS o LeuRS. Para distinguir las aaRS que contienen el dominio CAAD en adelante se les nombrará con el superíndice "C" (GluRS^C, ValRS^C, IleRS^C o LeuRS^C) y de forma genérica como aaRSs^C. Cada genoma codificaba como máximo una o dos de estas cuatro aaRSs^C. El análisis de los nuevos genomas de cianobacterias secuenciados más recientemente puso de manifiesto la presencia del dominio CAAD en otras tres aaRSs, también de clase I: ArgRS, MetRS y CysRS. El análisis reveló que la existencia de aaRSs^C es un fenómeno bastante extendido entre las especies del *phylum* de las cianobacterias, pues en el 36% de los genomas secuenciados se detecta al menos un gen de aaRSs^C (101 cianobacterias de 279 secuenciadas). En ocho genomas se detectó la presencia de dos genes de aaRSs^C en diferentes combinaciones (véase Tabla 3.1.1). De todas las aaRSs^C, la ValRS^C es la más extendida en las especies del *phylum*, pues se encuentra codificada en 79 genomas. La IleRS^C se encontró en 11, GluRS^C en 5, LeuRS^C en 2, ArgRS^C en 2, MetRS^C en 1 y CysRS^C en 1 especie (Tabla 3.1.2 y figura 3.1.1A).

Genoma	aaRS ^C -1	aaRS ^C -2
<i>Crinalium epipsammum</i> PCC 9333	CysRS	LeuRS
<i>Microcoleus vaginatus</i> PCC 9802	GluRS	IleRS
<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304	GluRS	IleRS
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112	GluRS	IleRS
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101	GluRS	IleRS
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 10802	GluRS	MetRS
<i>Spirulina major</i> PCC 6313	ArgRS	ValRS
<i>Spirulina subsalsa</i> PCC 9445	ArgRS	ValRS

Tabla 3.1.1.- Especies de cianobacterias que contienen 2 aaRS^C. Se indican las especies de cianobacterias en cuyo genoma se ha detectado la presencia de dos genes que codifican para aaRSs^C. Para cada especie se especifica la combinación de aaRSs^C siguiendo el código de colores de la figura 3.1.1.

79 genomas codifican para ValRS ^C	101 genomas codifican para 1 o 2 aaRS ^C
11 genomas codifican para IleRS ^C	
5 genomas codifican para GluRS ^C	
2 genomas codifican para LeuRS ^C	
2 genomas codifican para ArgRS ^C	
1 genoma codifica para MetRS ^C	
1 genoma codifica para CysRS ^C	
36% de las especies de cianobacterias contienen al menos 1 aaRS ^C	

Tabla 3.1.2.- Número de genomas que codifican cada aaRS^C. Se indica el número de especies de cianobacterias en las que se ha detectado cada una de las aaRSs^C. Los genomas que codifican dos aaRSs^C distintas se han cuantificado en ambas categorías.

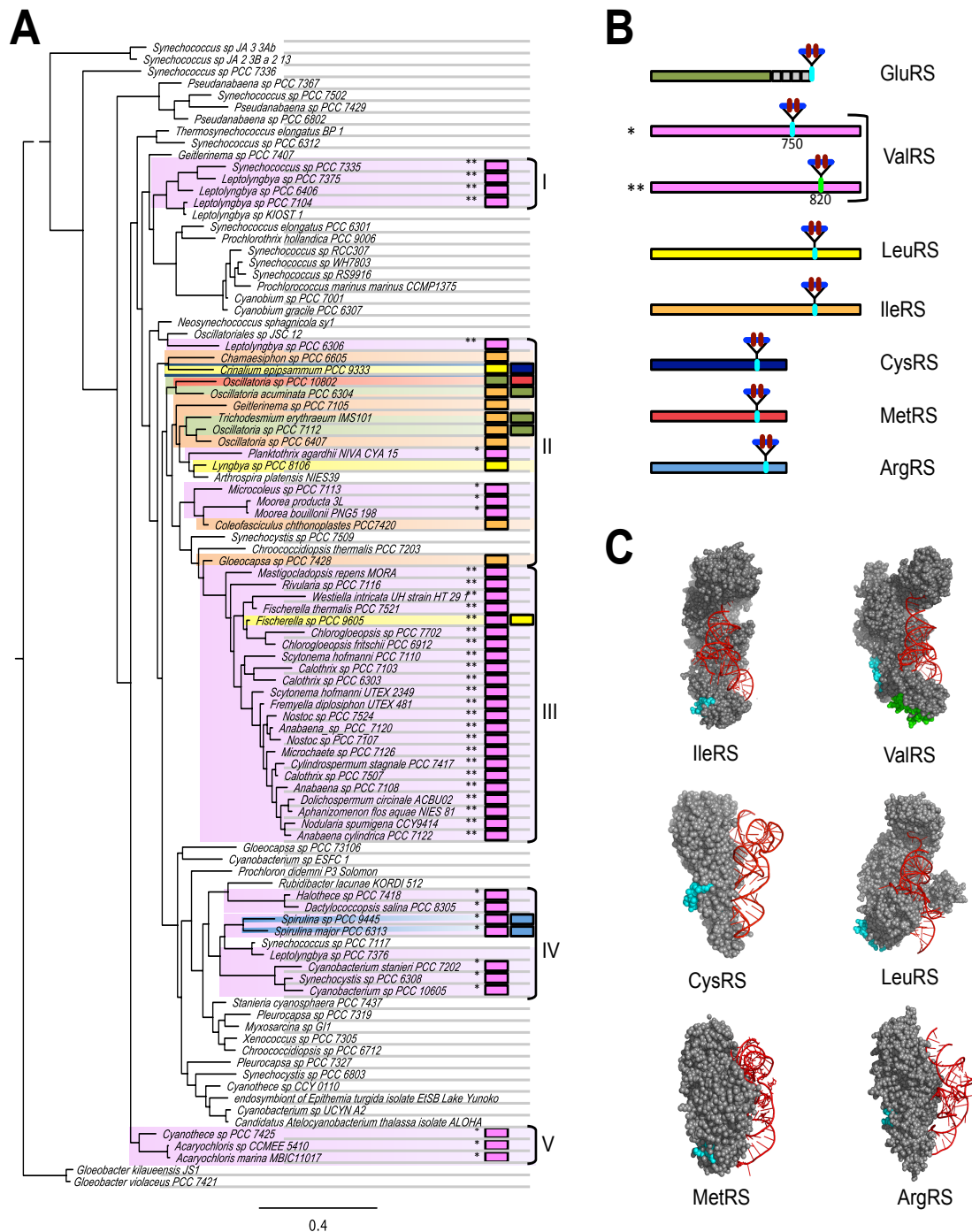


Figura 3.1.1.- Presencia del dominio CAAD en las aaRSs de cianobacterias. A) Árbol filogenético de especies de cianobacterias basado en la secuencia de los genes de rRNA 23S y 16S. Las especies que contienen alguna aaRS^C se destacan sobre un fondo coloreado. Aquellas especies que cuentan con ValRS^C en rosa, IleRS^C en naranja, LeuRS^C en amarillo, GluRS^C en verde, ArgRS^C en celeste, MetRS^C en rojo y CysRS^C en azul marino. Las ValRSs portadoras del dominio CAAD en la posición 750 u 820 se indican respectivamente con uno o dos asteriscos. Mediante llaves y números romanos se indican los grupos que contienen alguna aaRS^C. **B)** Diagrama que muestra la posición de la inserción del dominio CAAD en cada aaRS. El código de colores es el mismo que en (A). **C)** Representación de la estructura tridimensional de aaRSs bacterianas basadas en estructuras de la base de datos *Protein Data Bank* (Códigos PDB en orden descendente y de izquierda a derecha: 1FFY, HVS, 2BYT, 1LI5, 2CT8 y 1F7U). Los aminoácidos de la posiciones correspondientes al punto de inserción del dominio CAAD en la correspondiente aaRS^C se destacan en color cian. Para la ValRS^C se resaltan en cian y verde los puntos de inserción correspondientes a la posición 750 y 820 respectivamente. En rojo se representa el tRNA.

Cabe destacar que, al igual que ocurre para ValRS^C, LeuRS^C e IleRS^C (Luque *et al.*, 2008; Olmedo-Verd *et al.*, 2011), en las tres nuevas aaRSs^C identificadas en este trabajo la inserción del dominio CAAD tiene lugar en el extremo C-terminal de la proteína lejos del dominio catalítico (Figura 3.1.1B). También, de forma similar a lo observado para ValRS^C, LeuRS^C e IleRS^C, se comprobó que el punto de inserción en ArgRS^C, MetRS^C y CysRS^C correspondía a residuos superficiales de la cara opuesta a aquella que interacciona con el tRNA (Figura 3.1.1C).

3.1.2.- Localización subcelular de aaRSs^C

Con el objetivo de determinar si, al igual que la ValRS^C de *Anabaena*, el resto de aaRSs^C de otras especies se localizan en la membrana del tilacoide, se analizó la localización subcelular de un representante de cada aaRS^C utilizando *Anabaena* como sistema heterólogo de expresión. Los representantes elegidos fueron la LeuRS^C de *Lyngbya sp.* PCC 8106, la IleRS^C de *Trichodesmium erythraeum* IMS101, GluRS^C y MetRS^C de *Oscillatoria sp.* PCC 10802, ArgRS^C de *Spirulina major* PCC 6313 y la CysRS^C de *Crinalium epipsammum* PCC 9333. Los genes que codifican para estas aaRSs^C se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de la cianobacteria correspondiente y se fusionaron al extremo 3' de la ORF de la proteína verde fluorescente (GFP). La fusión se clonó en un vector que se introdujo en *Anabaena* mediante conjugación triparental (apartado 2.2.3). Las distintas fusiones se integrarían mediante recombinación simple en el locus de *argRS-C*, un gen no esencial en *Anabaena* en condiciones estándar de cultivo. Salvo GFP-LeuRS^C de *Lyngbya*, la expresión de otras fusiones provocaba aparentemente una alta toxicidad en *Anabaena* pues a pesar de numerosos intentos, no se obtuvieron exconjugantes. Los exconjugantes que habían integrado la fusión GFP-LeuRS^C de *Lyngbya* se analizaron mediante microscopía confocal para monitorizar la fluorescencia de la GFP (apartado 2.3.4.4.1). Como controles de la posición en la célula de proteínas solubles y proteínas de la membrana plasmática, se emplearon respectivamente estirpes de *Anabaena* que expresan la proteína GFP o el transportador de amonio Amt1 fusionado a GFP. Se observó que la fluorescencia de la GFP fusionada a la LeuRS^C de *Lyngbya* colocalizaba perfectamente con la fluorescencia roja de los pigmentos fotosintéticos (Figura 3.1.2, grupo de paneles de la izquierda) que sirven como indicador de la posición de las membranas tilacoidales.

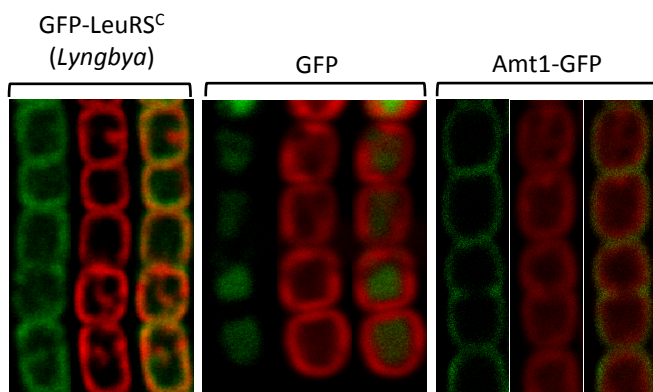


Figura 3.1.2.- Localización subcelular de la LeuRS^C de *Lyngbya* sp. PCC 8106 fusionada a GFP mediante expresión ectópica en *Anabaena*. Imágenes de microscopía confocal de filamentos de *Anabaena* que expresan la fusión GFP-LeuRS^C de *Lyngbya* (grupo de paneles de la izquierda), la proteína GFP (paneles centrales) y la proteína Amt1 fusionada a GFP (paneles de la derecha). Para cada grupo de paneles, la imagen de la izquierda muestra la fluorescencia de la GFP, la imagen central la fluorescencia de los pigmentos fotosintéticos y la de la derecha corresponde a la superposición de las anteriores.

Este resultado indica que, al igual que ocurre con la ValRS^C de *Anabaena*, LeuRS^C de *Lyngbya* también se localiza en la membrana tilacoidal, y sugiere a su vez que otras aaRSs^C de diferentes especies podrían localizarse asimismo en los tilacoides. Esto extiende el papel de carácter estructural propuesto por Olmedo-Verd *et al.* para CAAD como dominio de anclaje a membranas tilacoidales en *Anabaena* a otras especies de cianobacterias.

3.1.3.- Localización subcelular de las aaRSs de *Anabaena*

Un tercio de las especies de cianobacterias cuyo genoma se ha secuenciado contienen al menos una aaRS con dominio CAAD. Un aspecto particularmente llamativo es la presencia de diferentes aaRSs^C en las distintas especies, sin que ello guarde una relación aparente con su modo de vida, capacidades metabólicas o historia evolutiva. Parecería por tanto que el carácter seleccionado en estas especies es la presencia de una (o dos) aaRS en la membrana tilacoidal, independientemente de la identidad de la enzima. Ello nos llevó a plantear la hipótesis de que en estas cianobacterias la aaRS^C podría atraer otras aaRSs a la membrana, actuando como núcleo para la formación de un complejo traduccional en la cara citoplásmica de las membranas tilacoides. Puesto que en principio cualquier aaRS^C podría realizar este papel aglutinador, en las distintas especies se produciría un resultado similar aunque con variaciones en la arquitectura de los complejos. Esta hipótesis se apoya también en la existencia de complejos que agrupan distintas aaRSs a lo largo de toda la escala evolutiva (Hausmann & Ibba, 2008). Para analizar experimentalmente esta hipótesis se utilizó como modelo *Anabaena*, cuya ValRS contiene el dominio CAAD y se localiza en la membrana tilacoidal (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Las 19 aaRSs restantes carecen de dicho dominio o de cualquier otro que sugiera una posible interacción con membranas. Se analizó la localización subcelular de las 20 aaRSs de *Anabaena* mediante la expresión de proteínas de fusión con GFP y

microscopía confocal. Es importante destacar que *Anabaena*, como el resto de cianobacterias, carece de GlnRS (el Gln-tRNA^{Gln} se produce a través de la denominada vía indirecta (Luque *et al.*, 2008)) y cuenta con ThrRSs duplicadas, denominadas T1 y T2 (Napolitano *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2015). Para las aaRSs heterooligoméricas, PheRS y GlyRS, únicamente se fusionó la subunidad α de cada una de ellas a la GFP. De esta manera, se generaron 20 fusiones GFP-aaRS, las cuales se clonaron bajo el promotor inducible por cobre (*PpetE*) y se introdujeron en *Anabaena* por conjugación triparental. Tras inducir la expresión de cada fusión mediante la adición de cobre al medio de cultivo, la fluorescencia de la GFP se analizó por microscopía confocal.

Como se había observado previamente (Olmedo-Verd *et al.*, 2011), la fluorescencia verde de la fusión GFP-ValRS^C colocalizaba con la fluorescencia roja de los pigmentos fotosintéticos presentes en la membrana tilacoidal de *Anabaena* (Figura 3.1.3, primera fila de paneles). En cambio, la fluorescencia de las 19 proteínas de fusión restantes se detectó mayoritariamente en la parte central del citoplasma, siguiendo un patrón complementario al de los pigmentos fotosintéticos (Figura 3.1.3, resto de paneles) y similar al de la proteína GFP (Figura 3.1.2), lo que era indicativo de su localización en la porción soluble del citoplasma.

Se había descrito que durante el proceso de diferenciación de los heterocistos, la ValRS^C de *Anabaena* experimenta una relocalización que le lleva a ocupar los polos de la célula en heterocistos maduros (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Se decidió estudiar si el resto de aaRS, que no cuentan con el dominio CAAD, también experimentan un proceso de relocalización durante el desarrollo de heterocistos. Para ello, se cultivaron las 20 estirpes que expresan las fusiones GFP-aaRS en medio BG11₀ sólido, que carece de fuente de nitrógeno, para estimular el desarrollo de heterocistos. Tras 5 días de crecimiento en estas condiciones, se analizó la fluorescencia de la GFP en los heterocistos mediante microscopía confocal (Figura 3.1.4). Como se esperaba, la señal fluorescente de la fusión GFP-ValRS^C coincide con la fluorescencia roja de las membranas tilacoidales, distribuidas mayoritariamente en la zona más externa del citoplasma de las células vegetativas, mientras que en los heterocistos la fluorescencia verde se observaba confinada en los polos (Figura 3.1.4, primera fila de paneles). En contraste con esto, las 19 aaRS que carecen del dominio CAAD no exhibían indicios de relocalización en los heterocistos, mostrando en general un patrón similar al observado en las células vegetativas, es decir, una distribución en la porción soluble del citoplasma de la célula (Figura 3.1.4, resto de paneles).

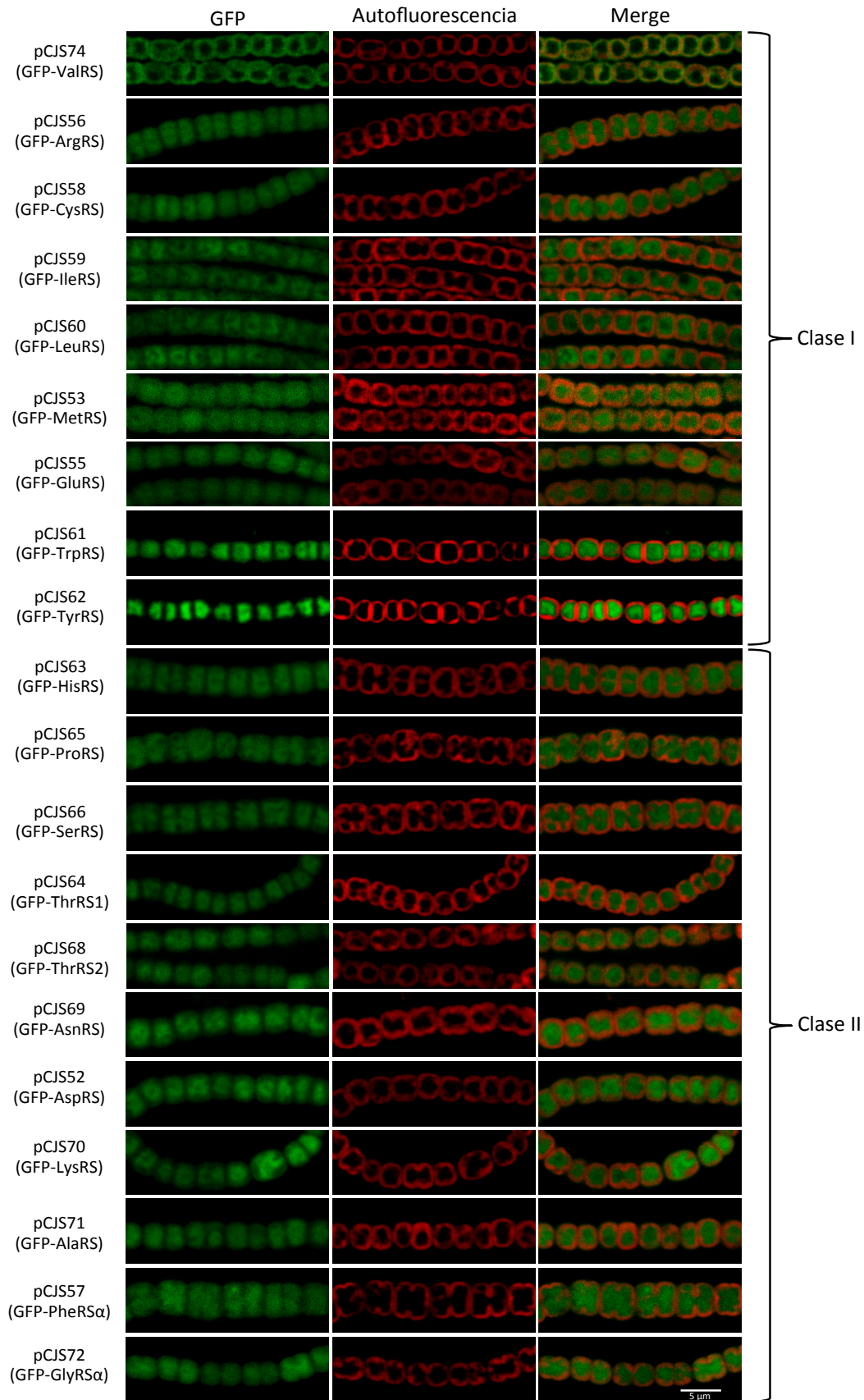


Figura 3.1.3.- Localización subcelular de las aaRSs de *Anabaena*. Imágenes de microscopía confocal de filamentos de *Anabaena* expresando las fusiones que se indican a la izquierda. Los paneles de la izquierda representan la fluorescencia de las fusiones con GFP; los paneles centrales, la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos; los paneles de la derecha corresponden a la superposición de los anteriores.

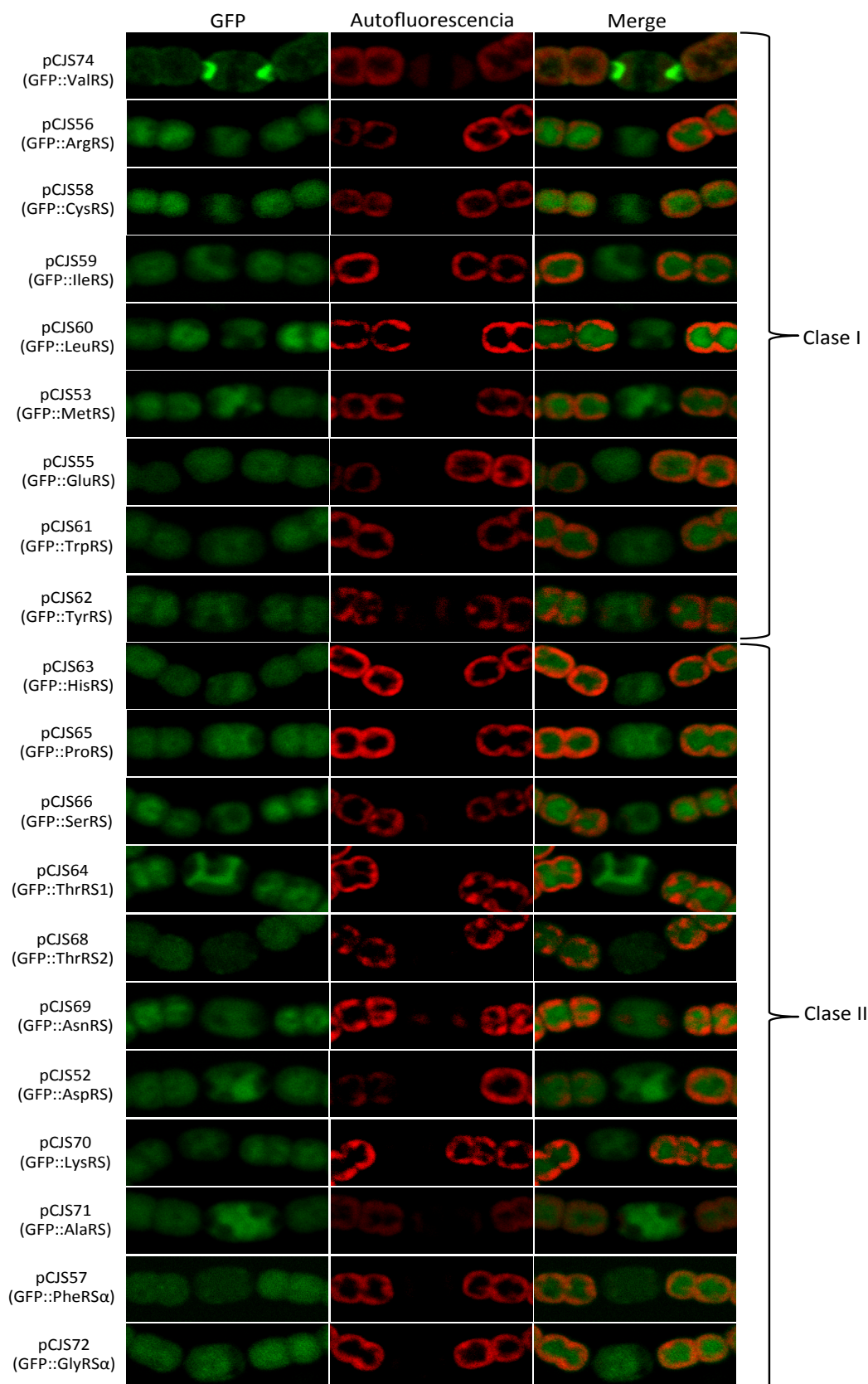


Figura 3.1.4.- Localización de las aaRSs en el heterocisto de *Anabaena*. Los paneles muestran imágenes de microscopía confocal de filamentos de *Anabaena* expresando las fusiones que se indican a la izquierda. Los paneles de la izquierda representan la fluorescencia de las fusiones con GFP; los paneles centrales, la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos; los paneles de la derecha, la superposición de los anteriores. En cada panel, la célula central con débil fluorescencia roja corresponde a un heterocisto.

3.1.4.- Análisis de la formación de complejos por las aaRSs de *Anabaena*

Los resultados anteriores pusieron de manifiesto una distribución asimétrica de las aaRSs en *Anabaena*, de modo que 19 de ellas se localizan en la porción soluble del citoplasma, mientras que ValRS^C lo hace en la membrana tilacoidal. Este panorama permitía descartar la hipótesis de la formación de un complejo traduccional estable en la superficie de los tilacoides y nos llevó a plantear una nueva hipótesis: la distribución subcelular de las aaRSs^C puede tener relación con funciones no canónicas, que pueden estar o no relacionadas con su actividad enzimática de aminoacilación. La realización de funciones distintas a la canónica es un fenómeno relativamente frecuente entre las aaRSs de distintos organismos (Guo *et al.*, 2010a; Guo *et al.*, 2010b), pero por el momento no se ha descrito para ninguna aaRS de cianobacterias. Puesto que en muchos casos la realización de funciones no canónicas implica la interacción con otras proteínas, se decidió investigar el interactoma de las 20 aaRSs de *Anabaena*. para ello, se llevó a cabo una aproximación experimental consistente en el *cross-linking in vivo* con formaldehído (apartado 2.3.3.4) de células de las 20 estirpes de *Anabaena* que expresan cada una de las aaRSs fusionadas a la GFP. Tras ello, se prepararon extractos celulares y se purificó cada una de las fusiones GFP-aaRS usando anticuerpos anti-GFP acoplados a microesferas magnéticas (*anti-tag MicroBeads, Miltenyi*).

Para aquellas estirpes que expresaban fusiones de las aaRSs solubles, la purificación se llevó a cabo a partir de la fracción soluble del extracto, mientras que para la estirpe que expresa la fusión ValRS^C-GFP, la purificación se realizó con extractos crudos o a partir de la fracción de membrana. Tras revertir el *cross-linking*, lo obtenido de cada purificación se resolvió mediante SDS-PAGE en geles con gradientes de concentración de acrilamida.

Para las 19 fusiones GFP-aaRS solubles, se obtuvo en todos los casos una banda de mayor intensidad cuyo tamaño coincidía con el esperado para la correspondiente fusión GFP-aaRS (Figura 3.1.5, puntas de flecha blancas). Cuando se analizaron estas bandas por espectrometría de masas, se confirmó la presencia de péptidos correspondiente a la GFP y la aaRS correspondiente. Además, se observaron numerosas bandas adicionales en cada calle. De entre ellas, únicamente se analizaron por espectrometría de masas las bandas diferenciales, es decir, aquellas que no están presentes en las calles control, que contienen el resultado de la purificación de la fracción soluble de *Anabaena* silvestre (C) o de una estirpe que expresa la proteína GFP (C') y que, presumiblemente, podrían ser proteínas que interaccionan con la aaRS. En total se analizaron 141 bandas. Sorprendentemente, a pesar de trabajar rápidamente, a baja temperatura y de añadir inhibidores de proteasas a todas las soluciones utilizadas, la mayoría de estas bandas correspondía a productos proteolíticos de la fusión

expresada en cada estirpe. No obstante, se identificaron algunas que podrían ser proteínas interactuantes con aaRS y que se presentan en la tabla 3.1.3.

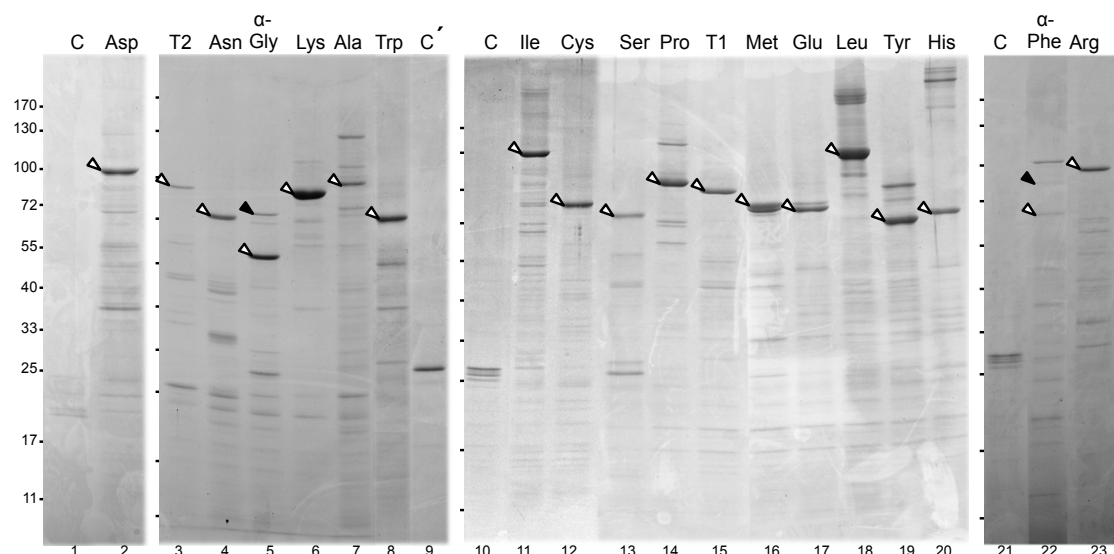


Figura 3.1.5.- Purificación de las fusiones GFP-aaRSs solubles de *Anabaena*. Cada panel corresponde a un gel SDS-PAGE. En cada calle se cargó la elución resultante de la purificación de la fracción soluble de células de *Anabaena* que expresan una fusión GFP-aaRS (la identidad de cada aaRS se indica encima de cada calle con el código de tres letras del aminoácido correspondiente). En las calles control, indicadas con la letra C o C', se cargó el resultado de la purificación de fracciones solubles de *Anabaena* silvestre o de una estirpe de *Anabaena* que expresa GFP, respectivamente. Las puntas de flecha blancas indican la correspondiente fusión GFP-aaRS. Las puntas de flecha negra indican la subunidad beta de la GlyRS (calle 5) y de la PheRS (calle 22). Las marcas de la izquierda corresponden a la posición de las bandas del marcador de peso molecular de proteínas.

Fusión	Proteína	Peso molecular (Da)	Anotación	Comentarios
GFP-AspRS	Alr7308	32219	Posible nucleasa HNH	
	Alr3067	36956	Proteína hipotética	
	Alr2954	20810	Posible hidrolasa NUDIX	
GFP-αGlyRS	Alr4111	79215	Subunidad beta de la glicil-tRNA sintetasa	En <i>Anabaena</i> la GlyRS es una enzima heterodimérica (αβ)
GFP-LysRS	All4019	58291	Glucosa-6-fosfato-1-dehidrogenasa	
GFP-SerRS	All4337(TufA)	44680	Factor de elongación Tu	
	Alr3402(ndK)	16473	Nucleosido difosfato kinasa	
GFP-ThrRS1	All4337(TufA)	44680	Factor de elongación Tu	
GFP-MetRS	Alr2312	53097	Posible peptidasa dependiente de zinc	
	Alr1845 (TrmB)	24848	tRNA (guanina-N(7))-metiltransferasa	
	All1975	44600	Proteína hipotética	
	All0914	39188	Posible glucosil transferasa	
	All4337 (TufA)	44680	Factor de elongación Tu	
GFP-GluRS	Alr2691	78787	Proteína hipotética	
	Alr5249	80693	Posible proteína de unión a ácidos nucleicos	

	Alr2784	92862	Posible fosfohidrolasa dependiente de metales	
	Alr2791	132044	Proteína WD-Repeat	
	All7286	34743	Proteína hipotética	
	Alr3115	114780	Posible metalopeptidasa	
	Alr1146	94725	Proteína hipotética (dominio GTPasa)	
	All0373	37983	Posible serina/treonina fosfatasa	
GFP-LeuRS	Alr1041(GlpX)	36606	D-fructosa 1,6-bifosfatasa clase 2/sedoheptulosa 1,7-bifosfatasa	
	Alr0529(CpcA)	17326	Cadena alfa de la ficocianina	
	Alr0021(ApcA1)	17215	Subunidad alfa 1 de la aloficocianina	
	All4337(TufA)	44680	Factor de elongación Tu	
GFP-αPheRS	Alr4958(PheT)	89031	Subunidad beta de la fenilalanil-tRNA sintetasa	PheRS es una proteína heterotetramérica ($\alpha\beta$) ₂
GFP-ArgRS	Alr7552	102324	RNA-helicasa dependiente de ATP	
	Alr7147	58826	Transposasa	
	All3333	47813	Proteína de unión a nitrato	
	All0862	34459	Regulador transcripcional de tipo LysR	

Tabla 3.1.3.- Listado de proteínas que co-purifican con las aaRSs solubles de *Anabaena*. Se indica el nombre, el peso molecular así como información sobre la anotación de cada proteína que co-purifica con la fusión indicada a la izquierda. En el caso de GlyRS y PheRS se indican algunos comentarios que se consideran relevantes.

Es importante destacar que GlyRS y PheRS son proteínas heterodiméricas y heterotetraméricas respectivamente. Para ambas enzimas se observó que las fusiones GFP-αGlyRS y GFP-αPheRS co-purificaban con sus respectivas subunidades beta, lo cual valida esta aproximación experimental al menos para la detección de complejos proteicos estables.

Para el caso de la fusión ValRS^C-GFP, tras la purificación a partir de extractos crudos (Figura 3.1.6A) o de fracción de membrana (Figura 3.1.6B), también se obtuvieron numerosos productos proteolíticos (indicados con círculos blancos) a pesar de tomar las precauciones indicadas anteriormente para evitar la proteólisis. En las purificaciones de extractos crudos de la estirpe que expresa ValRS^C-GFP, se observaron dos bandas diferenciales de 52 y 55 KDa (Figura 3.1.6A, calle 2) ausentes en las calles control. Éstas contienen lo obtenido de la purificación de extractos de una estirpe que expresa la fusión de la proteína GFP con una versión de la ValRS a la que se le ha delecionado el dominio CAAD (calle 1) o extractos de *Anabaena* silvestre (calle 3). El análisis de las bandas diferenciales (Figura 3.1.6A, puntas de

flecha negras) mediante espectrometría de masas permitió la identificación de las subunidades α (AtpA) y β (AtpB) de la F_0F_1 -ATP sintasa, cuyos pesos moleculares son 55 KDa y 52 KDa respectivamente.

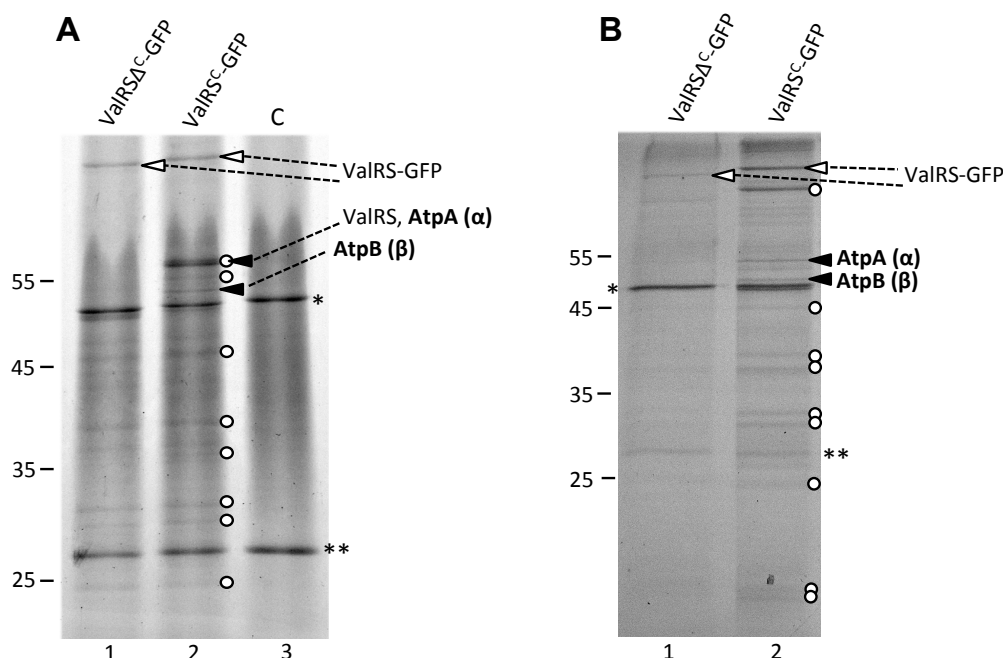
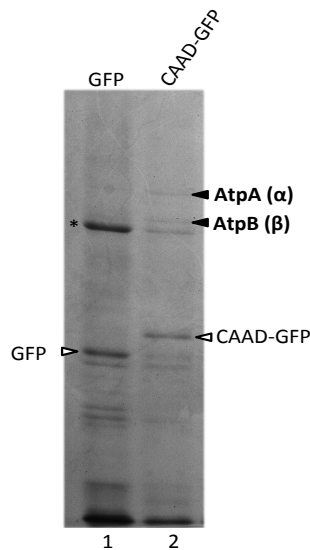


Figura 3.1.6.- Purificación de la fusión GFP-ValRS^C en *Anabaena*. (A) SDS-PAGE del resultado de la purificación con anticuerpos anti-GFP de extractos crudos de estirpes de *Anabaena* que expresan las fusiones indicadas arriba de cada calle. La calle control, indicada con la letra C, corresponde a la purificación a partir del extracto de *Anabaena* silvestre que no expresa ninguna proteína de fusión. Las puntas de flecha blancas indican la proteína de fusión. Las puntas de flecha negra indican las subunidades de la F_0F_1 -ATP sintasa. Los círculos blancos indican los productos proteolíticos de la ValRS. (*) indica la posición de la Rubisco; (**) indica la posición de la cadena ligera del anticuerpo utilizado en la purificación. (B) SDS-PAGE del resultado de la purificación con anticuerpos anti-GFP a partir de la fracción de membrana de estirpes de *Anabaena* que expresan las fusiones indicadas arriba de cada calle. Otros detalles se indican de forma similar a como se hace en (A). Los números de la izquierda corresponden a la posición de las bandas del marcador de peso molecular de proteínas.

Cuando la purificación se llevó a cabo a partir de la fracción de membrana, de nuevo se observaron bandas diferenciales de 52 y 55 KDa en la calle donde se cargó el resultado de la purificación de ValRS^C-GFP (Figura 3.1.6B, calle 2). Las proteínas presentes en esas bandas se identificaron de nuevo como las subunidades α y β de la F_0F_1 -ATP sintasa y, en algunos experimentos, se llegó a identificar también la subunidad γ (AtpC) (no mostrado). En todas las calles de las figuras 3.1.6A y 3.1.6B se observaron dos bandas prominentes, una de 50 KDa que se identificó como la subunidad larga de la RuBisCO y que se interpretó como un contaminante de nuestras purificaciones; y otra banda, de 28 KDa que corresponde a la cadena ligera del anticuerpo anti-GFP.

Hay que destacar que en ninguno de los casos anteriores las subunidades de la ATP sintasa co-purificaron con la versión de la ValRS que carece del dominio CAAD (ValRS Δ^C) (calle 1 de la figura 3.1.6A y 3.1.6B), lo que sugiere que el dominio CAAD podría estar implicado en la

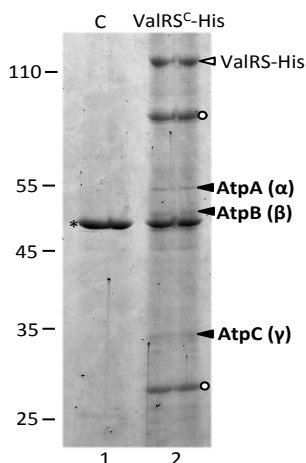
interacción con la ATP sintasa. Para confirmar esto, se llevó a cabo un experimento de co-purificación similar al anterior con fracciones de membrana de una estirpe de *Anabaena* que expresa la fusión CAAD-GFP y, como control, una estirpe que expresa la proteína GFP. Tras revertir el *cross-linking*, se cargó el resultado de la purificación en un gel de SDS-PAGE. Se



observaron dos bandas de 52 y 55 KDa en la calle correspondiente a la estirpe que expresa la fusión CAAD-GFP (Figura 3.1.7, calle 2) que estaban ausentes en la calle control de la estirpe que expresa la GFP (Figura 3.1.7, calle 1). Las proteínas de esas dos bandas se identificaron como las subunidades α y β de la F_0F_1 -ATP sintasa, lo que indica que el dominio CAAD estaría implicado en la posible interacción de la ValRS con subunidades de la ATP sintasa.

Figura 3.1.7.- Purificación de la fusión CAAD-GFP en *Anabaena*. Fracciones de membrana de estirpes de *Anabaena* que expresan las proteínas indicadas arriba se purificaron usando anticuerpos anti-GFP y se resolvieron en un gel de SDS-PAGE. Las puntas de flecha blanca indican la posición de la proteína expresada. Las puntas de flecha negra indican las subunidades de la F_0F_1 -ATP sintasa. (*) indica la posición de la RubisCO.

Para descartar la posibilidad de que los resultados obtenidos se debiesen a un artefacto derivado del uso de la proteína GFP como etiqueta, se llevaron a cabo experimentos de co-purificación similares a los anteriores con una estirpe de *Anabaena* que expresa la proteína ValRS^C fusionada a una etiqueta de hexa-histidina. Las fracciones de membrana de esta estirpe y, como control, de la estirpe silvestre de *Anabaena*, se sometieron a un proceso de purificación con anticuerpos anti-His acoplados a microesferas magnéticas (*anti-tag MicroBeads, Miltenyi*). Tras revertir el *cross-linking*, las distintas eluciones se resolvieron en un gel SDS-PAGE observándose bandas diferenciales de 55, 52 y 32 KDa en la calle de la estirpe que expresa ValRS^C-His (Figura 3.1.8, calle 2) y que estaban ausentes en la calle control. Las proteínas presentes en las bandas de 55, 52 y 32 KDa se identificaron respectivamente como



las subunidades α , β y γ de la F_0F_1 -ATP sintasa. Por lo tanto, se puede deducir que independientemente de la etiqueta utilizada, estas subunidades de la ATP sintasa co-purifican con la ValRS^C.

Figura 3.1.8.- Purificación de la fusión ValRS^C-His en *Anabaena*. Gel de SDS-PAGE con la purificación a partir de la fracción de membrana de una estirpe de *Anabaena* que expresa la fusión ValRS^C-His y de la estirpe silvestre de *Anabaena* (C). La punta de flecha blanca indica la posición de la fusión ValRS^C-His. Las puntas de flecha negra indican las subunidades de la F_0F_1 -ATP sintasa. Los círculos blancos indican la posición de los productos proteolíticos de ValRS^C. (*) indica la posición de la RubisCO. Los números de la izquierda corresponden a la posición de las bandas del marcador de peso molecular de proteínas.

3.1.5.- Análisis de la interacción ValRS-F_oF₁-ATP sintasa

3.1.5.1.- Ensayos de co-purificación recíproca

Los resultados expuestos anteriormente sugieren la interacción de ValRS^C con la F_oF₁-ATP sintasa. No obstante, para corroborar estos hallazgos se decidió acometer un experimento de co-purificación recíproca, es decir, purificar la ATP sintasa y comprobar si ValRS^C co-purifica con ella. Se fusionó la secuencia codificante de la proteína AtpA con la ORF de la proteína GFP, y el fragmento de DNA resultante se clonó en un vector movilizable por conjugación. La construcción se introdujo por conjugación triparental en dos fondos genéticos distintos: la estirpe silvestre de *Anabaena* y una estirpe que expresa la fusión ValRS^C-His. Las células de estas estirpes, junto con las estirpes parentales control, se sometieron a *cross-linking in vivo* y a posterior purificación de las respectivas fracciones de membrana con anticuerpos anti-GFP acoplados a microesferas magnéticas. Tras revertir el *cross-linking*, el resultado de la purificación se resolvió mediante SDS-PAGE. En las calles que expresan la fusión AtpA-GFP (Figura 3.1.9A, calles 2 y 3), independientemente del fondo genético, se observaron una serie de bandas ausentes en las calles control de las estirpes parentales (Figura 3.1.9A, calles 1 y 4). De entre todas las bandas de las calles 2 y 3, la de mayor intensidad, cuyo tamaño coincidía con el esperado para la fusión AtpA-GFP (82 KDa), se identificó como tal por espectrometría de masas (α -GFP en la figura 3.1.9A). Se analizaron también otras bandas diferenciales prominentes en las que se identificaron péptidos correspondientes a las subunidades β , γ , δ , b' , b y ϵ del complejo F_oF₁-ATP sintasa. En todos los casos el tamaño observado en el gel correspondía al tamaño teórico de la subunidad correspondiente: β (52 KDa), γ (35 KDa), δ (20 KDa), b' (19.7 KDa), b (18 KDa) y ϵ (15 KDa). Es necesario mencionar que la intensidad de estas bandas respecto a la banda de AtpA-GFP es consistente con la estequiometría de las subunidades del complejo F_oF₁-ATP sintasa, lo cual indica que la fusión AtpA-GFP se integra correctamente en el complejo. Además, se identificó una banda de aproximadamente 55 KDa como la subunidad α de la ATP sintasa, lo que indica que algunos complejos contienen tanto subunidades α -GFP como subunidades α endógenas. Es importante destacar que en las calles 2 y 3 se detectaron bandas diferenciales de en torno a 110 KDa cuyo tamaño no corresponde a ninguna subunidad de la ATP sintasa. Esta banda estaba ausente en los controles de las estirpes parentales y se identificó como la ValRS^C de *Anabaena*. Mediante western blot con anticuerpos anti-His se confirmó la presencia de ValRS en la posición de la banda de 110 KDa en el carril de la estirpe que expresa ValRS^C-His junto con la fusión AtpA-GFP (Figura 3.1.9B, calle 3). Estos resultados junto con los presentados anteriormente indican fuertemente que ValRS interacciona con la ATP sintasa en la membrana tilacoidal de *Anabaena*.

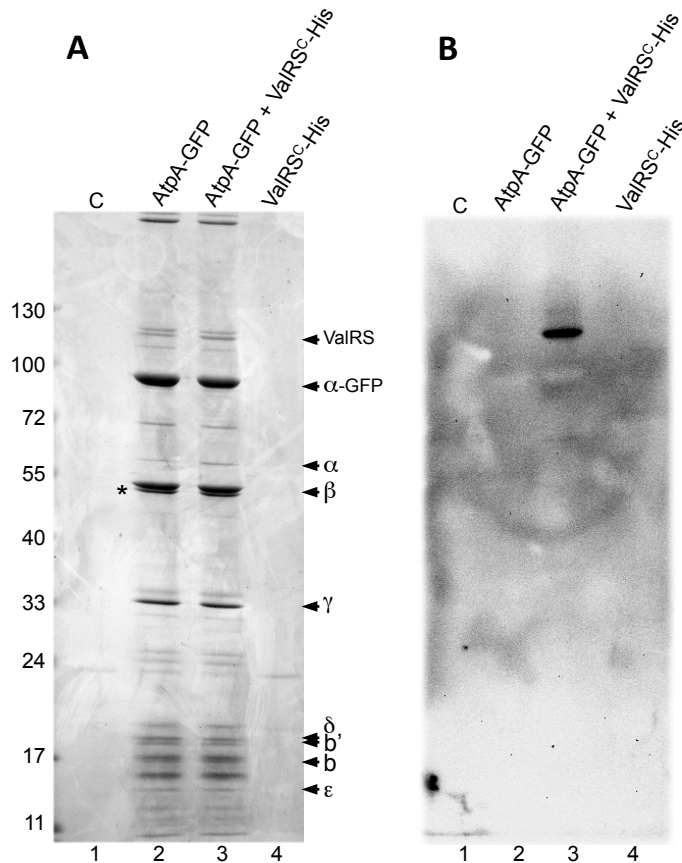


Figura 3.1.9.- Co-purificación de la fusión AtpA-GFP con otras subunidades de la ATP sintasa y con ValRS^C. (A) SDS-PAGE de fracciones de membrana purificadas con anticuerpos anti-GFP acoplados a microesferas magnéticas. Cada calle contiene el resultado de la purificación de las fracciones de células de *Anabaena* que expresan las proteínas indicadas arriba. La calle control (C) contiene la purificación de fracciones de células de *Anabaena* silvestre. Las proteínas identificadas por espectrometría de masas se indican a la derecha. (B) Western blot con anticuerpos anti-His de un gel idéntico al del panel (A).

3.1.5.2.- Ensayos de CN-native

La electroforesis bidimensional es una técnica ampliamente utilizada para el aislamiento y análisis de complejos proteicos de membrana. Entre sus variantes se encuentra la electroforesis *colorless-native* (CN-native), que es similar al *blue-native* con la diferencia de que en el CN-native no se utiliza el colorante azul coomassie, que puede desestabilizar las interacciones más débiles (Krause & Seelert, 2008). Los detalles del procedimiento de CN-native pueden consultarse en el apartado 2.3.3.3. En este tipo de electroforesis, los complejos proteicos se resuelven en una primera dimensión en condiciones nativas (con la presencia de un detergente suave) y a continuación los componentes de los diferentes complejos son separados en una segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes. Así, en la segunda dimensión los elementos de un mismo complejo se localizarán sobre la misma vertical, mientras que los elementos que forman parte de varios complejos lo harán sobre la misma horizontal.

En primer lugar, se llevó a cabo una optimización de la técnica para adecuarla al tipo de muestra a analizar y a la resolución del problema a estudiar. Para facilitar la detección de la ValRS se decidió emplear la estirpe que expresa la fusión ValRS^C-GFP ya que ello permitía detectar su presencia con anticuerpos anti-GFP. En el CN-native se emplean detergentes

suaves para evitar la agregación de las proteínas (Wittig *et al.*, 2007; Wittig & Schagger, 2008), de entre los que se eligió la digitonina por ser uno de los que mejor preserva la integridad de los complejos. Tras fraccionar las células, se midió la concentración de clorofila de la fracción de membrana y se determinó la concentración de digitonina a usar en la primera dimensión. Para ello se probaron distintas relaciones digitonina/clorofila comprendidas entre 5 y 100 g digitonina/g clorofila. Tras añadir la cantidad necesaria de detergente, se incubaron las preparaciones de membrana durante 30 minutos a 4°C y se cargó un volumen de muestra correspondiente a 5 µg de clorofila en un gel nativo de la primera dimensión en gradiente de poliacrilamida del 3%-13%. La concentración de detergente adecuada sería aquella que permitiera solubilizar las membranas y disociar los agregados de proteínas sin desestabilizar los complejos proteicos. En la figura 3.1.10 se muestran los resultados obtenidos. Con 5 g/g de digitonina se observaron precipitados de color verde en la zona del pocillo (punta de flecha negra), lo que indicaba que existían agregados tilacoidales sin solubilizar que no entraban en el gel. A partir de 10 g/g de digitonina esos agregados desaparecían, si bien, con relaciones superiores a 10 g/g se observaba la desaparición de algunas de las bandas coloreadas, lo que indicaba la desestabilización de algunos complejos fotosintéticos. Por lo tanto, para los experimentos de CN-*native* se decidió emplear relaciones digitonina/clorofila de 10 g/g.

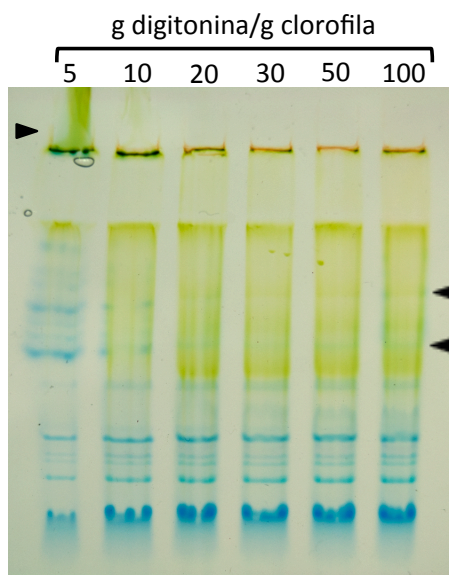


Figura 3.1.10.- Optimización de la concentración de digitonina en los ensayos de CN-*native*. Gel nativo en gradiente de poliacrilamida del 3%-13%. Cada carril corresponde a fracciones de membrana de células de una estirpe de *Anabaena* que expresa la fusión ValRS^C-GFP tratadas con digitonina en la relación indicada arriba del panel (en g de detergente/ g de clorofila). Las puntas de flecha negra indican la posición de los complejos que se han tenido en cuenta como criterio para elegir la concentración de digitonina adecuada.

Una vez determinada la concentración de digitonina a utilizar, llevamos a cabo los ensayos de CN-*native* con la estirpe de *Anabaena* que expresa la fusión ValRS^C-GFP. En la primera dimensión, la fusión ValRS^C-GFP se detectó en la zona de alto peso molecular, lo que indicaba que se encontraba formando parte de un complejo de gran tamaño. En la segunda dimensión (Figura 3.1.11A, panel intermedio) ValRS^C-GFP se localizó en la zona de 130 KDa,

correspondiente al tamaño de la fusión ValRS^C-GFP, lo cual se confirmó mediante western blot con anticuerpos anti-GFP (figura 3.1.11A, panel inferior). Las proteínas de su misma vertical (caja I, figura 3.1.11A), con las que potencialmente ValRS^C formaría un complejo, se purificaron y se identificaron por espectrometría de masas. La identidad de estas proteínas se presenta en la tabla de la figura 3.1.11B. Entre ellas, se encontraron las subunidades α (AtpA), β (AtpB) y γ (AtpC) (Figura 3.1.11A, manchas 5, 6 y 8 de la caja I) lo que sugiere que forman parte del mismo complejo. Además, AtpA, AtpB y AtpC se detectaron en otra vertical de una zona del gel correspondiente a complejos de menor tamaño (Figura 3.1.11A, manchas 11, 12 y 13 de la caja II). Esta observación sugiere que parte del complejo ATP sintasa se desplaza a la zona de alto peso molecular por la interacción con ValRS^C.

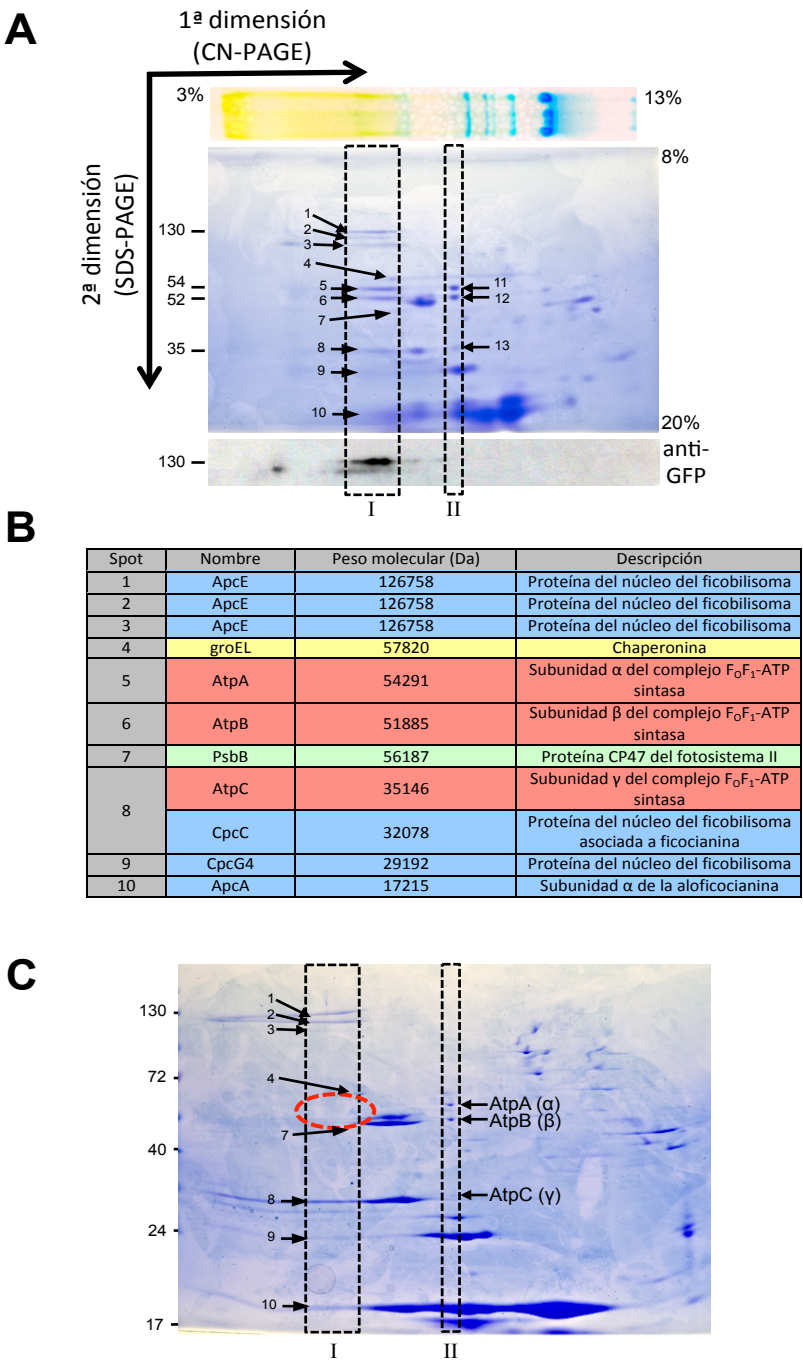


Figura 3.1.11.- Análisis de la interacción ValRS^C-ATP sintasa mediante CN-native. (A) Gel CN-native de fracción de membrana de células de *Anabaena* que expresan la fusión ValRS^C-GFP. El panel superior muestra el resultado de la separación de los complejos en una primera dimensión nativa. El panel intermedio muestra el resultado de la segunda dimensión desnaturalizante en la que se resuelven los componentes de los complejos separados en la primera dimensión. El panel inferior muestra el resultado de un western blot con anticuerpo anti-GFP sobre un gel idéntico al del panel intermedio. Las cajas con línea discontinua enmarcan las verticales en las que se han detectado las subunidades de la ATP sintasa. Los números indican las proteínas identificadas por espectrometría de masas. **(B)** Tabla que presenta la identidad de las proteínas observadas en geles CN-native e identificadas por MALDI-TOF. Cada color agrupa las proteínas identificadas según su categoría funcional: en azul, las proteínas pertenecientes al ficobilisoma; en amarillo, una chaperonina; en rojo, las subunidades de ATP sintasa; en verde, proteína del fotosistema. **(C)** CN-native de fracciones de membrana de células de un mutante de *Anabaena* que expresa la versión ValRS^Δ. El círculo rojo simboliza la ausencia de subunidades de ATP sintasa en la zona de alto peso molecular.

Por otra parte, cuando se llevó a cabo un experimento de CN-native idéntico al anterior con una estirpe de *Anabaena* que expresa únicamente una versión de ValRS a la que se le ha deletado el dominio CAAD (ValRS Δ^C), las proteínas AtpA, AtpB y AtpC se detectaron únicamente en la vertical de la zona de bajo peso molecular (Figura 3.1.11C, caja II). Este resultado sugiere que la integración de la ATP sintasa en el complejo de alto peso molecular (Figura 3.1.11C, caja I) requiere la presencia de ValRS Δ^C en la membrana tilacoidal.

3.1.5.3.- Localización subcelular de la proteína de fusión AtpA-GFP

Una vez demostrada la interacción entre ValRS y el complejo ATP sintasa, se decidió analizar la localización de la proteína AtpA con el objetivo de comprobar si seguía la misma distribución que ValRS. Para ello, una estirpe de *Anabaena* que expresa la fusión AtpA-GFP y una estirpe que expresa la proteína de fusión GFP-ValRS Δ^C se cultivaron en condiciones diazotróficas con el fin de inducir el desarrollo de heterocistos y analizar mediante microscopía confocal la distribución de ambas proteínas de fusión tanto en células vegetativas como en heterocistos. Como se observa en la figura 3.1.12, la distribución de AtpA-GFP en células

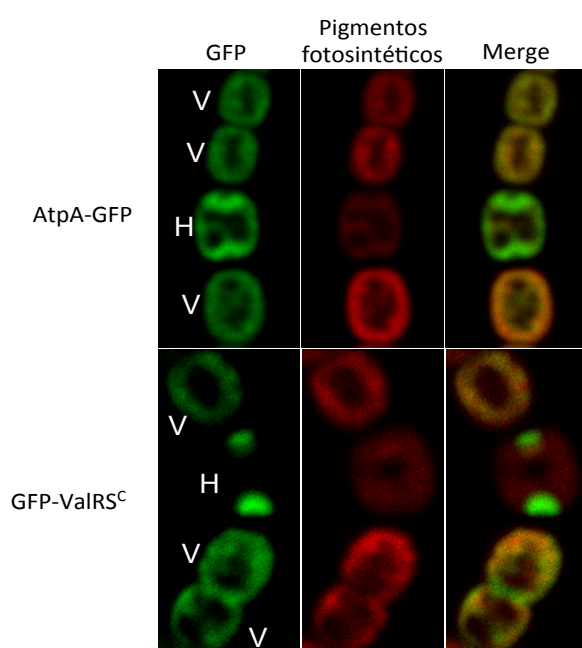


Figura 3.1.12.- Localización subcelular de AtpA-GFP. Imágenes de microscopía confocal de filamentos de *Anabaena* expresando las proteínas de fusión indicadas a la izquierda. Los paneles de la izquierda muestran la fluorescencia de la GFP; los paneles centrales la fluorescencia de los pigmentos fotosintéticos; los paneles de la derecha muestran la superposición de los anteriores. V: células vegetativas; H: heterocistos.

vegetativas coincide plenamente con la fluorescencia de los pigmentos fotosintéticos situados en la membrana de los tilacoides (paneles superiores), lo que indica que el complejo ATP-sintasa se localiza en la membrana tilacoidal de *Anabaena*. Esta distribución es idéntica a la observada para la proteína GFP-ValRS Δ^C en células vegetativas (paneles inferiores). En heterocistos maduros, ValRS Δ^C se localiza exclusivamente en los polos del mismo. AtpA se acumula también en los polos del heterocisto aunque no de forma exclusiva. Estos resultados sugieren que en los heterocistos la interacción entre ValRS y ATP sintasa tendría lugar sólo en las regiones en las que colocalizan.

3.1.6.- Consecuencias fisiológicas de la interacción ValRS-F₀F₁-ATP sintasa

Para determinar las consecuencias fisiológicas derivadas de la interacción entre la ValRS y ATP sintasa y, dada la dificultad de reproducir *in vitro* esta interacción, decidimos analizar *in vivo* los posibles efectos de ésta.

Una de las hipótesis con las que trabajamos es que puesto que ValRS^C consume ATP en la reacción de aminoacilación, la interacción con la ATP sintasa podría tener un influencia sobre su actividad catalítica. Para probar esta hipótesis se llevaron a cabo medidas de actividad ValRS (apartado 2.3.4.2) con extractos de células de *Anabaena* silvestre y de un mutante (mutante Δ^C) al que se le ha sustituido el alelo *valS* silvestre por una versión a la que se ha deletado el dominio CAAD, de forma que la interacción ValRS-ATP sintasa no tiene lugar. Como se esperaba, la actividad ValRS en el mutante Δ^C se encontró en la fracción soluble mientras que en el silvestre la actividad se detecta en la fracción de membrana (figura 3.1.13). La actividad específica de la ValRS en extractos totales fue similar para ambas estirpes (0.115 ± 0.009 pmol [¹⁴C]-Val-tRNA^{Val}/min · µg de proteína para el silvestre y de 0.128 ± 0.010 pmol [¹⁴C]-Val-tRNA^{Val}/min · µg de proteína para el mutante Δ^C). Este resultado sugiere que la interacción que tiene lugar entre ValRS y ATP sintasa no influye en la actividad de la aaRS.

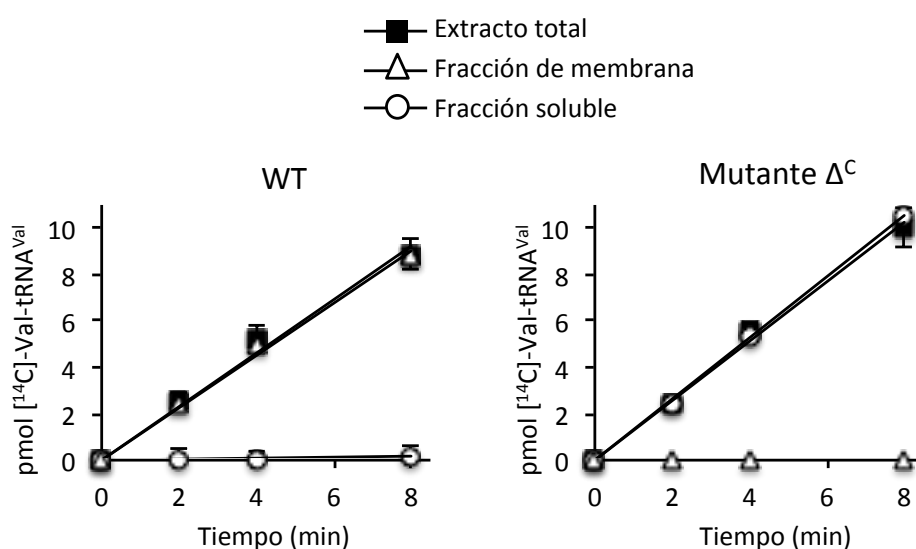


Figura 3.1.13.- Medidas de la actividad ValRS en fracciones celulares de *Anabaena* silvestre y el mutante Δ^C . Medida de los pmol de [¹⁴C]-Val incorporados respecto al tiempo en extractos totales (cuadrados negros), fracción de membrana (triángulos blancos) y fracción soluble (círculos blancos) de células de la estirpe silvestre de *Anabaena* (WT) y del mutante Δ^C .

Se consideró entonces que el flujo de información podría ir en sentido inverso, y se planteó la hipótesis de que ValRS^C podría actuar como un sensor de la concentración de aminoácidos mediante la percepción de la concentración de su aminoácido específico (valina), que sería un indicador del estado metabólico de la célula, y transducir esta información al

complejo F_0F_1 -ATP sintasa que en consecuencia podría adecuar su actividad al estado nutricional. Para comprobar esta hipótesis y, dada la dificultad técnica que supone medir la actividad ATP sintasa *in vitro*, decidimos llevar a cabo una medida indirecta que reflejase la actividad ATP sintasa en *Anabaena* silvestre y el mutante Δ^C . Para ello, medimos la concentración de ATP intracelular en células de la estirpe silvestre de *Anabaena* y del mutante Δ^C haciendo uso del juego de reactivos *ATP Biomass Kit HS (BioThema)*, basado en la emisión de luz por actividad luciferasa, la cual es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra (más detalles en el apartado 2.3.4.3).

En los ensayos iniciales se usaron cantidades de clorofila que oscilaban entre 10 y 50 ng de clorofila. Al contrario de lo esperado, a medida que aumentaba la cantidad de clorofila en el ensayo, disminuía la emisión de luz (Figura 3.1.14A), lo cual se debía probablemente al apantallamiento de la luz emitida provocado por el exceso de células. Se probó entonces con cantidades comprendidas entre 1 y 10 ng de clorofila, con lo que se eliminaba el efecto de sombreamiento. Sin embargo, la luz emitida no era proporcional a la cantidad de biomasa del ensayo (Figura 3.1.14B), lo que indica la saturación de la reacción en el tiempo de ensayo. Para evitarlo se utilizaron cantidades menores de clorofila comprendidas entre 0.1 y 1 ng de clorofila. En este ensayo se observó una relación lineal entre la biomasa del ensayo y la emisión de luz cuando la cantidad de clorofila en el ensayo era menor 0.2 ng (Figuras 3.1.14C y D).

Una vez optimizado el ensayo, se llevó a cabo la determinación de la concentración intracelular de ATP en células de la estirpe silvestre de *Anabaena* y del mutante Δ^C cultivadas en condiciones estándar. La concentración de ATP en las células de la estirpe silvestre fue de 2.01 ± 0.12 mM (media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar, $n=3$), mientras que en las células del mutante Δ^C fue de 1.87 ± 0.33 mM. Por lo tanto, ambas estirpes tienen prácticamente el mismo contenido en ATP intracelular.

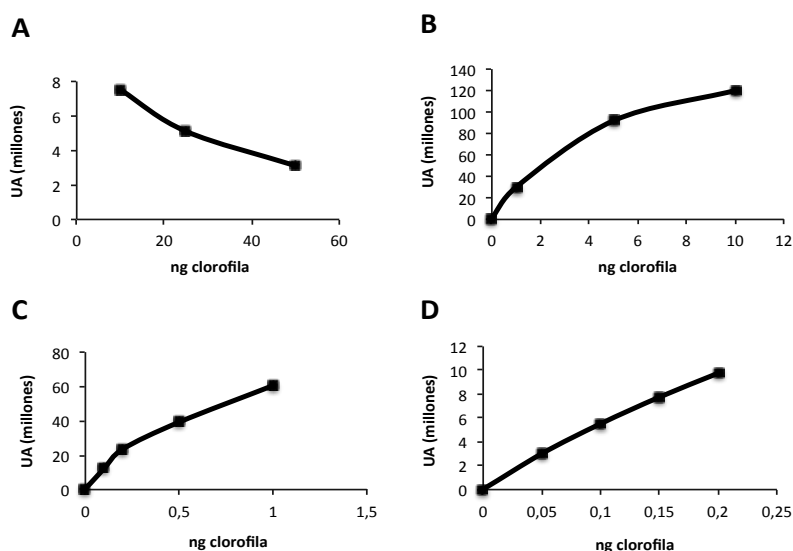


Figura 3.1.14.- Optimización de la cantidad de biomasa a usar en los ensayos de medida de la concentración intracelular de ATP. Representación de la emisión de luz (en millones de unidades arbitrarias, UA) respecto a los ng de clorofila en el ensayo.

Previamente se había descrito que un mutante de *Anabaena* en el que el dominio CAAD se había deletado de ValRS^C crecía más lentamente que la estirpe silvestre en condiciones de escasez de nitrógeno provocadas por la adición al medio de cultivo de L-metionina sulfoximina (MSX) (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Se analizó el contenido de ATP en células del mutante Δ^C y del silvestre cuando sometíamos ambas estirpes a la presencia de MSX. Cultivos en condiciones estándar cuya concentración de clorofila era de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ se dividieron en dos, a uno de ellos se dejó sin tratar, y al otro se añadió MSX a concentración final 2.5 μM . Tras 4 horas de tratamiento se llevaba a cabo la medida de concentración intracelular de ATP. En la figura 3.1.15 se observan los resultados obtenidos de tres experimentos independientes. Éstos indicaron que no había diferencias en el contenido de ATP en células del silvestre y el mutante Δ^C en condiciones de escasez de nitrógeno.

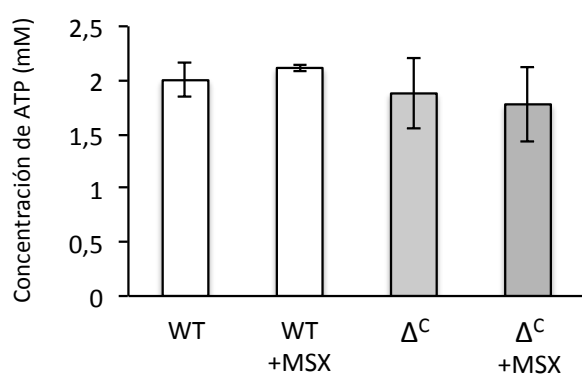


Figura 3.1.15.- Concentración intracelular de ATP en *Anabaena* silvestre y el mutante Δ^C bajo condiciones de escasez de nitrógeno. Representación en forma de histograma del contenido intracelular de ATP en *Anabaena* silvestre (WT) y el mutante Δ^C en presencia y ausencia de MSX.

3.2 DISCUSIÓN

3.2.1.- Adquisición del dominio CAAD por las aaRSs de cianobacterias a lo largo de la evolución

Al inicio de este trabajo se habían descrito 14 especies de cianobacterias cuyo genoma codifica alguna de las cuatro aaRSs^C conocidas en ese momento (ValRS^C, GluRS^C, LeuRS^C e IleRS^C) (Luque *et al.*, 2008; Olmedo-Verd *et al.*, 2011). La disponibilidad de nuevos genomas secuenciados ha permitido identificar numerosas especies adicionales que poseen alguna de estas cuatro aaRSs^C. Además se ha detectado la presencia del dominio CAAD en otras tres aaRSs (MetRS, ArgRS y CysRS) en diversas cianobacterias. Con la información disponible actualmente se ha comprobado que aproximadamente un tercio de las especies cianobacterianas con genoma secuenciado codifica al menos una aaRS^C. Puesto que a medida que se analizan más secuencias genómicas se identifican nuevas aaRSs con el dominio CAAD, cabría la posibilidad de que existan otras aaRSs^C en la Naturaleza aún por identificar. Un rasgo común de las aaRSs^C identificadas hasta ahora es que todas son de clase I y monoméricas. Es posible que las restricciones estructurales asociadas al anclaje en la membrana sean más difíciles de asumir por las aaRSs que deben formar oligoméros para ser activas, lo que puede haber penalizado la adquisición del dominio CAAD durante la evolución de estas enzimas. Ello podría explicar que no se haya detectado la presencia del dominio CAAD en aaRSs oligoméricas.

La presencia de CAAD en distintas aaRSs es un ejemplo de intercambio de dominios (*domain shuffling*) (Di Roberto & Peisajovich, 2014), un fenómeno cuyo mecanismo molecular está poco estudiado particularmente en procariotas y que describe la existencia de un mismo dominio en distintas proteínas. Se desconoce si la adquisición del dominio CAAD por parte de las aaRSs ha tenido lugar mediante inserción, recombinación, transposición u otro mecanismo alternativo. En el caso particular de la GluRS, en la que CAAD aparece como una extensión C-terminal, es probable que la adquisición de CAAD haya tenido lugar mediante fusión génica, lo que es consistente con la observación de que en algunas especies de cianobacterias cercanas evolutivamente a aquellas que poseen GluRS^C (*Lyngbya* sp. PCC 8106, *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Arthrospira maxima* CS-328 y *Oscillatoria* sp. PCC 6506), el gen *curt1*, homólogo a CAAD, se encuentra inmediatamente aguas abajo del gen *gltX*, que codifica la GluRS. Un análisis superficial indica que lo largo de la evolución habrían tenido lugar al menos 8 eventos independientes de adquisición de este dominio, uno para cada una de las 7 aaRSs^C salvo para ValRS, que probablemente lo haya adquirido en dos ocasiones de forma independiente ya que en distintas especies el dominio se encuentra en dos posiciones alternativas de la proteína. Algunos eventos habrían tenido lugar recientemente en la evolución, de ahí que las aaRSs^C

estén presentes en muy pocas cianobacterias (Figura 3.1.1, clado II), mientras que otros eventos habrían sido probablemente más tempranos, lo que se deduce de la observación de que la aaRS^C correspondiente está ampliamente extendida en algunos grupos filogenéticos (Figura 3.1.1, clados de III-V). Sorprendentemente, análisis filogenéticos más detallados de la superfamilia CURT1/CAAD llevados a cabo por colaboradores de nuestro grupo sugieren que no sólo ValRS, sino también LeuRS e IleRS habrían adquirido CAAD en múltiples ocasiones (Figura 3.2.1). Ello se basa en la observación de que las secuencias de CAAD de una misma aaRS^C de distintas especies aparecen en distintas ramas del árbol filogenético de la superfamilia CURT1/CAAD. Otra observación muy interesante es que secuencias de CAAD de diferentes aaRS^C se agrupan en el árbol filogenético en un mismo grupo (clados III en la figura

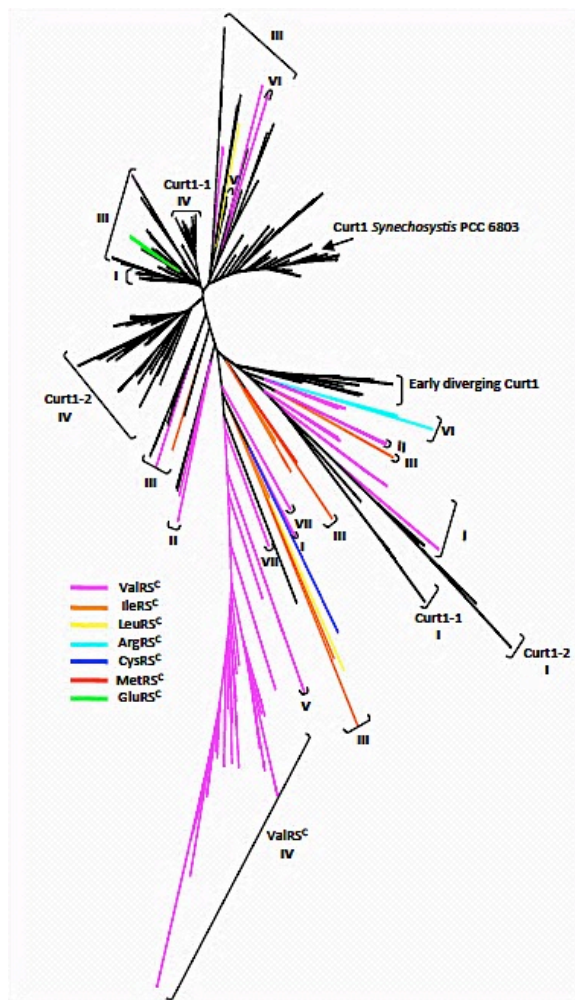


Figura 3.2.1.- Análisis filogenético de CURT1/CAAD en cianobacterias. El código de colores identifica a la aaRS^C a la que cada dominio CAAD pertenece (mismo código que en la figura 3.1.1B).

3.2.1) lo que podría indicar una relación filogenética cercana y podría sugerir que el dominio CAAD se habría transferido por algún mecanismo desconocido de una aaRS^C a otra. Esta idea es particularmente interesante pero su demostración requiere más investigación.

La adquisición de un mismo dominio por parte de distintas aaRS no es exclusivo de las aaRS^C de cianobacterias. Por el contrario es un fenómeno frecuente en aaRS de eucariotas y procariotas. Claros ejemplos son el dominio WHEP, el dominio EMAPII o las hélices N-terminales presentes en diferentes aaRS de eucariotas (Guo & Yang, 2013).

La adquisición recurrente del dominio CAAD sugiere fuertemente que las aaRS^C cumplen alguna función importante en la membrana tilacoidal, posiblemente no relacionada con su función canónica de aminoacilación. Llama la atención que en

cloroplastos no exista ninguna aaRS^C, a pesar de que derivan de una cianobacteria ancestral y de que poseen genes *CURT1*. En *A. thaliana*, ninguna de las 9 aaRS cloroplásticas de origen cianobacteriano (incluidas la GluRS e IleRS) cuenta con el dominio CAAD (Duchene *et al.*,

2005), lo que sugiere que el ancestro cianobacteriano de los cloroplastos no contenía ninguna aaRS^C y durante la evolución de los cloroplastos no tuvieron lugar posteriores eventos de adquisición de este dominio.

3.2.2.- Localización subcelular de las aaRSs en cianobacterias

Aunque Olmedo-Verd y colaboradores demostraron que en *Anabaena* la ValRS^C se localiza en la membrana tilacoidal (Olmedo-Verd *et al.*, 2011), no se había estudiado si otras aaRSs^C siguen el mismo patrón de distribución subcelular. En este trabajo hemos intentado expresar de forma ectópica en *Anabaena* un representante de cada aaRS^C fusionada a GFP. Sin embargo, para todas las aaRSs^C salvo para LeuRS^C de *Lyngbya* sp. PCC 8106, fue imposible la obtención de exconjugantes que expresaran la fusión, presumiblemente por la toxicidad resultante de la presencia de estas enzimas en *Anabaena*. Ello estaría en consonancia con la baja frecuencia de fenómenos de transferencia horizontal observada en un estudio global para genes de la maquinaria de traducción (Sorek *et al.*, 2007). Para el caso de la LeuRS^C de *Lyngbya*, que sí se expresó con éxito en *Anabaena*, su localización coincidía con la de los pigmentos fotosintéticos de la membrana tilacoidal (Figura 3.1.2), mostrando una distribución similar a la observada para la ValRS^C de *Anabaena*. Este resultado es congruente con la detección de actividad LeuRS en fracciones de membrana de *Lyngbya* (Olmedo-Verd *et al.*, 2011) y sugiere que en las especies que contienen otras aaRSs^C, éstas también se localizarían en la membrana tilacoidal. Por otra parte, se ha observado que cuando se expresa la ValRS^C de *Anabaena* en *E. coli*, la proteína se localiza en la membrana plasmática, lo que evidencia que el dominio CAAD posee una capacidad inherente de dirigir y anclar proteínas a la bicapa lipídica (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Puesto que las cianobacterias cuentan con dos sistemas de membrana, surge la pregunta de cómo se dirigen las aaRSs^C específicamente a la membrana tilacoidal. Posibles mecanismos son la existencia de alguna señal que atrae al dominio CAAD a la membrana tilacoidal o la presencia de algún factor de interacción que captura a la aaRS^C una vez se ha insertado en estas membranas. Cualquiera de estos papeles podría protagonizarlo la ATP sintasa que, como se ha demostrado en este trabajo, interacciona con ValRS^C.

En este trabajo se presentan resultados que ofrecen una visión global de la distribución de todas las aaRSs de *Anabaena*. Salvo ValRS^C, el resto de aaRSs se localizan en la porción soluble del citoplasma tanto en células vegetativas como en heterocistos. Esto contradice nuestra hipótesis sobre la posible formación de complejos que aglutinasen elementos de la maquinaria traduccional en la cara citoplásmica de la membrana tilacoidal. No obstante, aún no podemos descartar que la formación de tales complejos tenga lugar en

determinadas condiciones. A este respecto cabe resaltar que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 la β -GlyRS forma agregados en la superficie de los tilacoides bajo condiciones de estrés lumínico por alta luz (Bryan *et al.*, 2014).

3.2.3.- Análisis del patrón de interacciones de las aaRSs de *Anabaena*

La distribución asimétrica de las aaRSs en *Anabaena*, con una enzima en la membrana tilacoidal y las 19 restantes en el citoplasma, es muy llamativa y planteaba que tal configuración podía estar relacionada con funciones no canónicas de las aaRSs, un fenómeno frecuente en organismos de los tres dominios de la vida (Guo & Schimmel, 2013). El hecho de que en algunos casos las funciones adicionales se activan por interacción con otros factores, llevó a analizar el interactoma de las aaRSs de *Anabaena*.

Entre las aaRSs solubles no se detectó la formación de complejos estables con otras proteínas para IleRS, CysRS, TyrRS, TrpRS, AlaRS, HisRS, ProRS y AsnRS, al menos bajo las condiciones probadas en el estudio. En cambio para LeuRS, ArgRS, MetRS, GluRS, T1, SerRS, LysRS y AspRS se detectaron posibles proteínas interactuantes cuyas identidades se resumen en la tabla 3.1.3. Estas posibles interacciones han de ser validadas mediante acercamientos alternativos. Es particularmente interesante la posible interacción entre SerRS, LeuRS, MetRS o T1 con el factor de elongación Tu (EF-Tu). En la naturaleza se han identificado numerosos ejemplos de aaRSs de bacterias que interactúan con EF-Tu, o en arqueas y eucariotas con su homólogo, el factor de elongación 1A (EF1A) (Motorin *et al.*, 1991; Bec *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 1994; Negrutskii *et al.*, 1999; Hausmann *et al.*, 2007; Guzzo & Yang, 2008; Hausmann & Ibba, 2008; Havrylenko & Mirande, 2015). La posible interacción del EF-Tu con las distintas aaRSs de *Anabaena* es probablemente binaria ya que no se detecta co-purificación de aaRSs. Las aaRSs y el EF-Tu llevan a cabo etapas sucesivas durante la traducción: la formación del aa-tRNA por parte de la aaRS, y la liberación del aa-tRNA al ribosoma por parte del EF-Tu. Se ha propuesto que la formación de complejos entre el EF-Tu (o EF1A) y las aaRSs favorece la eficiencia de la traducción por canalización de sustrato ya que de esta forma la aaRS puede transferir directamente el aa-tRNA al EF-Tu evitando su liberación y difusión en el citoplasma (Negrutskii & Deutscher, 1991; Stapulionis & Deutscher, 1995; Kyriacou & Deutscher, 2008; Mirande, 2010). En el caso de las enzimas de clase I cuyo paso limitante en la catálisis es la liberación del aa-tRNA, se piensa que la interacción con el EF-Tu podría acelerar la liberación del producto y favorecer la reacción. Otras observaciones, como la interacción directa de algunas aaRSs de arqueas con el ribosoma también sugieren que existe canalización de sustrato durante la

traducción y que ésta es ventajosa para la célula (Godinic-Mikulcic *et al.*, 2011; Godinic-Mikulcic *et al.*, 2014; Raina *et al.*, 2012).

En este trabajo se muestran pruebas de que en la membrana tilacoidal de *Anabaena* tiene lugar la interacción entre ValRS^C y el complejo F₀F₁-ATP sintasa. Dicha interacción se ha revelado mediante varias aproximaciones alternativas. La purificación de ValRS^C-GFP a partir de fracciones de membrana y extractos totales (Figura 3.1.6) o de ValRS^C-His a partir de fracciones de membrana (Figura 3.1.8), resultaban de forma repetitiva en la co-purificación de las subunidades α (AtpA), β (AtpB) y, en ocasiones, la subunidad γ (AtpC) de la ATP-sintasa. El uso de diferentes fusiones elimina la posibilidad de artefactos derivados del uso de una etiqueta específica. Frente a la posibilidad de que la presencia de subunidades de la ATP sintasa en nuestras purificaciones pudiera deberse a la gran abundancia de ésta en la membrana tilacoidal, la co-purificación de la proteína de fusión AtpA-GFP con ValRS^C indica que esta interacción ocurre verdaderamente *in vivo*. Consistentemente, en ensayos de CN-native ValRS^C se detecta en la zona de alto peso molecular, pero sólo si contiene el dominio CAAD. De hecho, los datos presentados en este trabajo indican que la interacción entre ValRS^C y F₀F₁-ATP sintasa tiene lugar a través del dominio CAAD, ya que su delección elimina la interacción. Por otra parte, la co-localización subcelular de la ATP sintasa, que se ha puesto en evidencia mediante la fusión AtpA-GFP en la membrana tilacoidal de células vegetativas de *Anabaena* también está de acuerdo con la existencia de esta interacción. En heterocistos, en cambio, la localización de AtpA y ValRS^C sólo coincide parcialmente en los polos de la célula, por lo que en este tipo celular la interacción sólo podría ocurrir en las zonas polares.

Aunque la existencia de complejos en los que están implicados una o varias aaRSs está bastante extendida en arqueas y eucariotas, es un fenómeno poco habitual en bacterias (Hausmann & Ibba, 2008), lo que confiere cierta relevancia a la identificación realizada en este trabajo de un complejo estable entre la ValRS y la ATP sintasa de una cianobacteria.

3.2.4.- Consecuencias fisiológicas de la interacción entre ValRS y F₀F₁-ATP sintasa

En este trabajo hemos investigado el papel de la interacción establecida entre ValRS y ATP-sintasa en la membrana tilacoidal de *Anabaena*. Algunas interacciones favorecen la actividad canónica de aminoacilación de las aaRSs (Motorin *et al.*, 1991; Bec *et al.*, 1994; Reed & Yang, 1994; Simos *et al.*, 1996; Negrutskii *et al.*, 1999; Roca *et al.*, 2002; Praetorius-Ibba *et al.*, 2007; Praetorius-Ibba *et al.*, 2005; Godinic *et al.*, 2007; Hausmann *et al.*, 2007; Guzzo & Yang, 2008; Godinic-Mikulcic *et al.*, 2011). En cambio, algunas aaRSs son enzimas *moonlighting* capaces de llevar a cabo funciones adicionales a la de aminoacilación que en ocasiones se

activan mediante la interacción con otras proteínas (Guo & Schimmel, 2013; Guo *et al.*, 2010a). La interacción entre ValRS^C y la ATP sintasa no parece tener impacto sobre la función canónica de ValRS^C, pues las medidas de actividad ValRS en células de la estirpe silvestre de *Anabaena* (en las que la interacción con ATP sintasa tiene lugar) y en células del mutante Δ^C (en las que no se da la interacción) son similares (Figura 3.1.13). Ello llevó a considerar si ValRS^C podría regular la actividad de la ATP sintasa. Puesto que se había descrito que el mutante Δ^C muestra un retardo en el crecimiento respecto a la estirpe silvestre en condiciones de limitación de nitrógeno (Olmedo-Verd *et al.*, 2011), nos planteamos la hipótesis de que ValRS podría actuar como un sensor de la disponibilidad de aminoácidos, posiblemente percibiendo la concentración intracelular de su aminoácido específico, valina, y transmitir esta señal a la ATP sintasa para que esta adecue su funcionamiento al estado nutricional de la célula. Esta hipótesis es particularmente atractiva ya que en principio cualquier aaRS^C puede actuar como sensor de su aminoácido específico. Por tanto, asumiendo que las otras aaRSs^C también interaccionan con la ATP sintasa en las especies correspondientes, cualquiera de ellas podría ejercer este papel señalizador, lo que podría explicar la existencia de distintas aaRSs^C en diferentes especies. No obstante, no se observaron diferencias en la concentración de ATP de células de *Anabaena* silvestre y del mutante Δ^C en condiciones estándar y en condiciones de limitación de nitrógeno (Figura 3.1.15). Aunque este resultado no apoya nuestra hipótesis, es posible que la influencia de ValRS^C sobre la ATP sintasa tenga únicamente efectos sutiles. Por otra parte, la medida de la concentración de ATP puede que no refleje fielmente la actividad de la ATP sintasa, ya que en la célula existen mecanismos alternativos de producción de ATP como la fosforilación a nivel de sustrato. Por lo tanto, el papel de la interacción requiere de un estudio detallado de las actividades ATP sintasa y ATPasa del complejo F₀F₁.

La localización de ValRS en la membrana tilacoidal es un fenómeno poco frecuente entre las aaRSs. Se han descrito ejemplos de aaRSs en la membrana en *Entamoeba histolytica* y algunas células humanas (Castro de Moura *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012). Sin embargo, en estos casos las aaRSs se encuentran en la membrana de forma transitoria llevando a cabo funciones distintas a la aminoacilación. Sólo en cianobacterias existen aaRSs catalíticamente activas unidas de forma permanente a un sistema de membranas. La interacción entre ValRS^C y ATP sintasa descrita en este trabajo podría sugerir una función *moonlighting* de ValRS^C en *Anabaena*, algo que requiere de más investigación, y que podría explicar la distribución asimétrica de las aaRSs en *Anabaena* y, por extrapolación, en aquellas cianobacterias que cuentan con alguna aaRS^C.

4

CAPÍTULO II

**Análisis de la relocalización subcelular de ValRS^c
durante la diferenciación de heterocistos en *Anabaena***

4.1 RESULTADOS

Análisis de la relocalización subcelular de ValRS^C durante la diferenciación de heterocistos en *Anabaena*

Como se ha mencionado anteriormente, en los heterocistos ValRS^C se localiza en los polos celulares, lo que contrasta fuertemente con su localización en células vegetativas. Resultados previos del grupo indican que el dominio CAAD es responsable de la localización polar de ValRS^C en los heterocistos (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Puesto que los heterocistos se diferencian a partir de células vegetativas, se deduce que de forma paralela al proceso de diferenciación tiene lugar una relocalización de ValRS^C en el interior celular. Para estudiar la dinámica de relocalización de ValRS^C durante la diferenciación se utilizó la proteína de fusión GFP-CAAD, que en cuanto a su distribución subcelular se comporta de forma idéntica a ValRS^C (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Esta proteína se expresó a partir de *PpatS*, un promotor temprano y específico de células en proceso de diferenciación (Mariscal *et al.*, 2007). Ello permitía sincronizar la expresión del gen testigo con el inicio del proceso de diferenciación y monitorizar la fluorescencia de la proteína sintetizada *de novo* desde etapas iniciales del desarrollo. La fusión *PpatS*-GFP-CAAD se transfirió a *Anabaena* por conjugación y se seleccionaron exconjugantes que hubieran integrado la construcción en el locus neutral *nucA-nuiA* por recombinación simple. La estirpe de *Anabaena* resultante se cultivó rutinariamente en medio BG11 en condiciones estándar de cultivo. La diferenciación de heterocistos se indujo transfiriendo las células a medio BG11₀ (medio carente de cualquier fuente de nitrógeno) y se cultivó en condiciones estándar de luz y temperatura durante 24 horas. La fluorescencia de la proteína GFP-CAAD se analizó en distintos estados del proceso de diferenciación mediante microscopía confocal. Como control, se empleó una estirpe de *Anabaena* que expresa la proteína GFP bajo el promotor del gen *patS*.

A las 6 horas tras el inicio de la inducción, la señal fluorescente de GFP-CAAD se observó exclusivamente en la periferia del citoplasma del proheterocisto (Figura 4.1.1A, primera fila de paneles), mostrando una perfecta colocalización con la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos de la membrana tilacoidal. A las 12 horas, la fluorescencia de la proteína GFP-CAAD se localizaba mayoritariamente en la periferia del proheterocisto, aunque comenzaba a acumularse en los polos (Figura 4.1.1A, segunda fila de paneles). A 18 horas del inicio de la diferenciación, la fluorescencia permanecía en la periferia del citoplasma, si bien, la señal en los polos era mucho más evidente. Es importante destacar que en este estado de la diferenciación la señal fluorescente de GFP-CAAD se observaba con gran intensidad de forma muy cercana al septo que separa al proheterocisto de la célula vegetativa vecina, en la región

que se conoce como "cuello" del heterocisto (Figura 4.1.1A, tercera fila de paneles; figura 4.1.1B, primera fila de paneles).

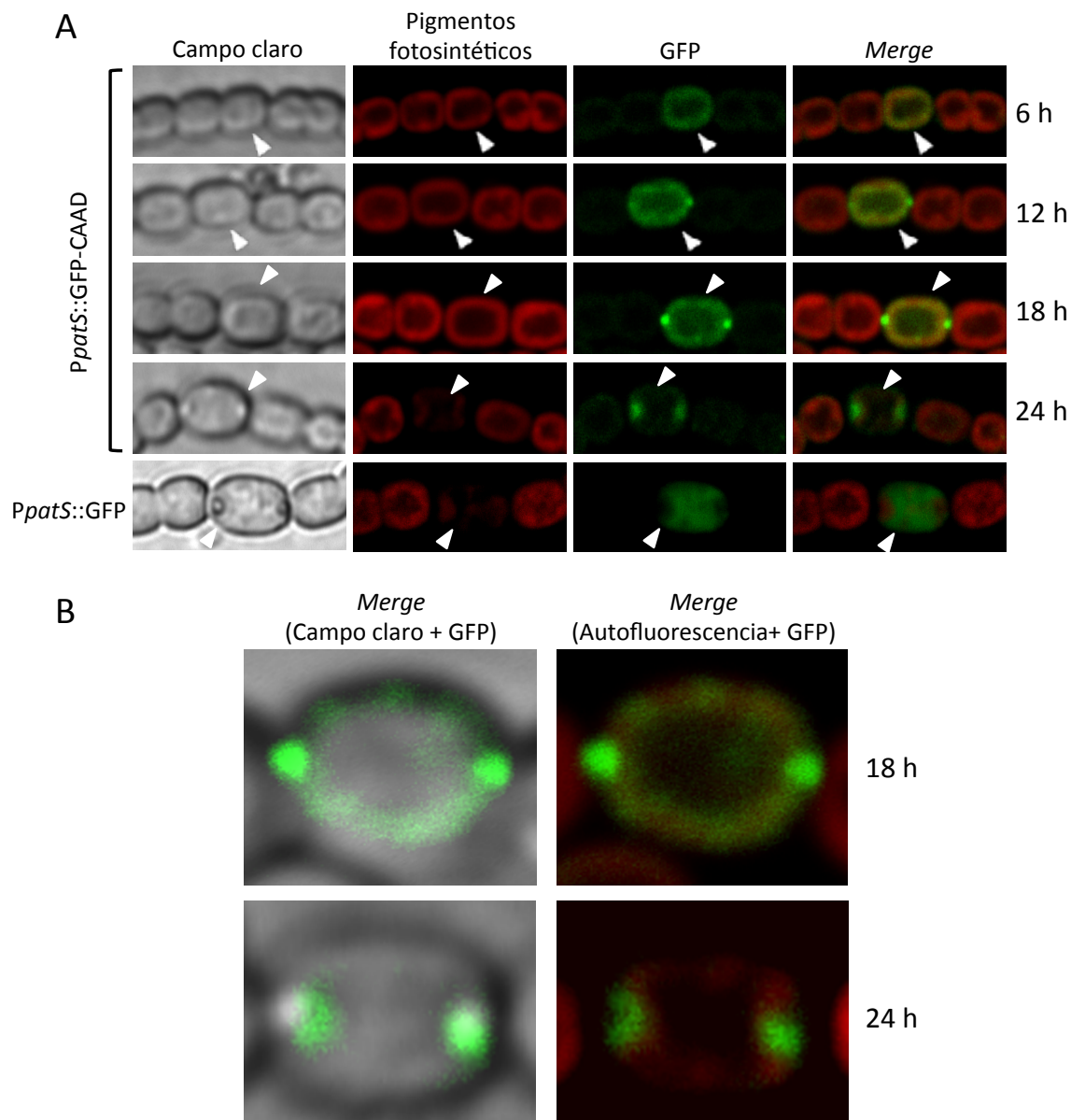


Figura 4.1.1.- Dinámica de relocación de GFP-CAAD en el heterocisto de *Anabaena*. (A) Imágenes de microscopía confocal de filamentos de *Anabaena* expresando la proteína de fusión GFP-CAAD (cuatro filas superiores) o la proteína GFP (fila inferior) bajo el promotor del gen *patS*. El primer grupo de paneles muestran la imagen de campo claro, el segundo grupo de paneles muestran la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos, el tercer grupo muestra la fluorescencia de la GFP y en el cuarto grupo se representa la superposición de los dos paneles anteriores. Las flechas blancas indican la posición del heterocisto. (B) Superposición de imágenes de microscopía confocal de heterocistos de *Anabaena* expresando la proteína de fusión GFP-CAAD bajo el promotor del gen *patS* a las 18 y 24 horas desde el inicio del desarrollo del heterocisto. Se observa con mayor detalle la disposición de la proteína GFP-CAAD en el cuello del heterocisto (18 horas) y rodeando al gránulo de cianoficina tras internalizarse (24 horas).

A las 24 horas de inducción, cuando los heterocistos son maduros y los gránulos de cianoficina son claramente visibles (gránulo refráctil), la señal GFP-CAAD se detecta exclusivamente en los polos del heterocisto, habiendo desaparecido de otras zonas de la

célula. En este estado sin embargo, la señal de los polos no se encuentra en el cuello del heterocisto sino en una zona interna que parece rodear al gránulo de cianoficina y que podría coincidir con el espacio que ocupan las membranas *honeycomb* (Figura 4.1.1A, cuarta fila de paneles; figura 4.1.1B, segunda fila de paneles). En la estirpe control que expresa la proteína GFP desde el promotor *PpatS* se observó que la fluorescencia se situaba en la zona interna del citoplasma durante todo el proceso de diferenciación (en la Figura 4.1.1A, en la quinta fila de paneles se muestra la localización de esta proteína a las 24h del inicio de la diferenciación).

Para analizar con más detalle la distribución de la proteína GFP-CAAD en los polos del heterocisto, se llevó a cabo un tratamiento de deconvolución de imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia de la estirpe que expresa la fusión GFP-CAAD tras 16 y 24 horas de crecimiento en ausencia de nitrógeno combinado. La deconvolución es un tratamiento matemático que permite eliminar o reducir la distorsión óptica del microscopio mediante la integración de distintas secciones en una imagen tridimensional compuesta. Ello permitió mostrar con claridad que a las 16 horas de limitación de nitrógeno la señal fluorescente de la proteína GFP-CAAD está muy próxima al septo que separa el heterocisto de la célula vecina y es externa a la fluorescencia roja de las membranas tilacoidales, lo que indica su localización en el cuello del heterocisto (Figura 4.1.2, panel izquierdo). En cambio, a las 24 horas, cuando el heterocisto es maduro y se han formado los gránulos de cianoficina, la fluorescencia de GFP-CAAD permanece en una localización polar pero se internaliza, alejándose del septo y adopta una forma de cuenco que parece rodear el gránulo de cianoficina (Figura 4.1.2, panel derecho).

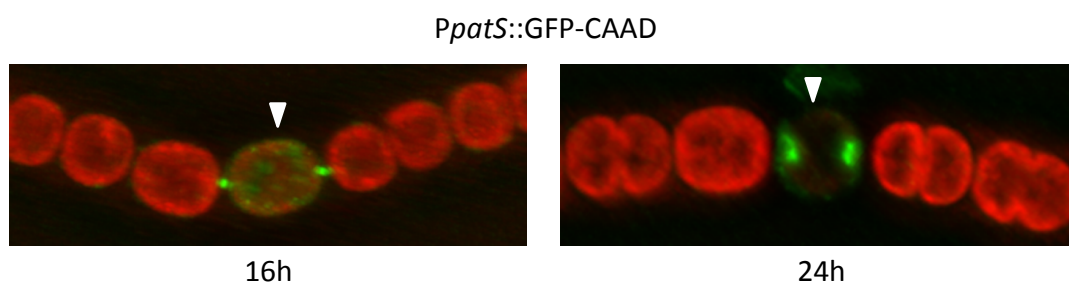


Figura 4.1.2.- Detalle de la distribución de la proteína GFP-CAAD en los polos del heterocisto. Deconvolución de imágenes tomadas al microscopio de fluorescencia de filamentos diazotróficos de *Anabaena* expresando la proteína GFP-CAAD desde el promotor del gen *patS*. Las puntas de flecha blancas indican la posición del heterocisto.

En los enlaces que se adjuntan a continuación pueden observarse animaciones en tres dimensiones de filamentos de *Anabaena* cuyos heterocistos expresan la fusión GFP-CAAD a las 16 y 24 horas desde inicio del desarrollo.

16 h- <https://www.dropbox.com/s/s7ww921tqa6nnw/Video%20patS%2016h.gif?dl=0>

24 h- <https://www.dropbox.com/s/rwcgrpo6x7u587g/V%C3%ADdeo%20PatS%2040h.gif?dl=0>

4.1.1.- Expresión de la fusión GFP-CAAD bajo el control de promotores específicos de células vegetativas o heterocisto

Los resultados de la sección anterior junto con otros previos del grupo pusieron de manifiesto que la diferenciación del heterocisto va acompañada de un proceso paralelo de relocalización de la proteína ValRS^C conducido de algún modo por el dominio CAAD. Ello llevó a plantear como objetivo dilucidar el mecanismo molecular que media la relocalización de ValRS^C. Para ello se plantearon tres hipótesis no excluyentes :

- a) La acumulación de ValRS^C en los polos del heterocisto ocurre mediante la inserción específica de proteína sintetizada *de novo* una vez iniciado el proceso de diferenciación (Figura 4.1.3A).
- b) La acumulación de ValRS^C en los polos del heterocisto ocurre por una reorganización de las membranas tilacoidales que durante la diferenciación se hacen menos abundantes en las zonas periféricas y se acumulan en los polos formando las membranas *honeycomb*. ValRS^C se desplazaría de forma pasiva, transportándose como integrante de la membrana tilacoidal (Figura 4.1.3B).
- c) La acumulación de ValRS^C en los polos del heterocisto ocurre por un desplazamiento independiente de la proteína ValRS^C en el plano de la membrana tilacoidal, dirigiéndose en su movimiento hacia membranas situadas en regiones polares (Figura 4.1.3C).

Para probar estas hipótesis se generaron fusiones transcripcionales de la proteína GFP-CAAD con promotores específicos de células vegetativas o heterocistos. Como promotor específico de células vegetativas se eligió el promotor del gen *susA* de *Anabaena*, que codifica para una sacarosa sintasa (Curatti *et al.*, 2006). Se esperaba que, dada la gran estabilidad de la proteína GFP, esta construcción nos permitiese monitorizar la dinámica de la proteína GFP-CAAD preexistente al inicio de la diferenciación y distinguir su dinámica de la de la proteína que se sintetiza *de novo* tras la diferenciación. De esta forma, los cambios de localización de la proteína se deberían exclusivamente al movimiento y no a la inserción específica de proteína de nueva síntesis.

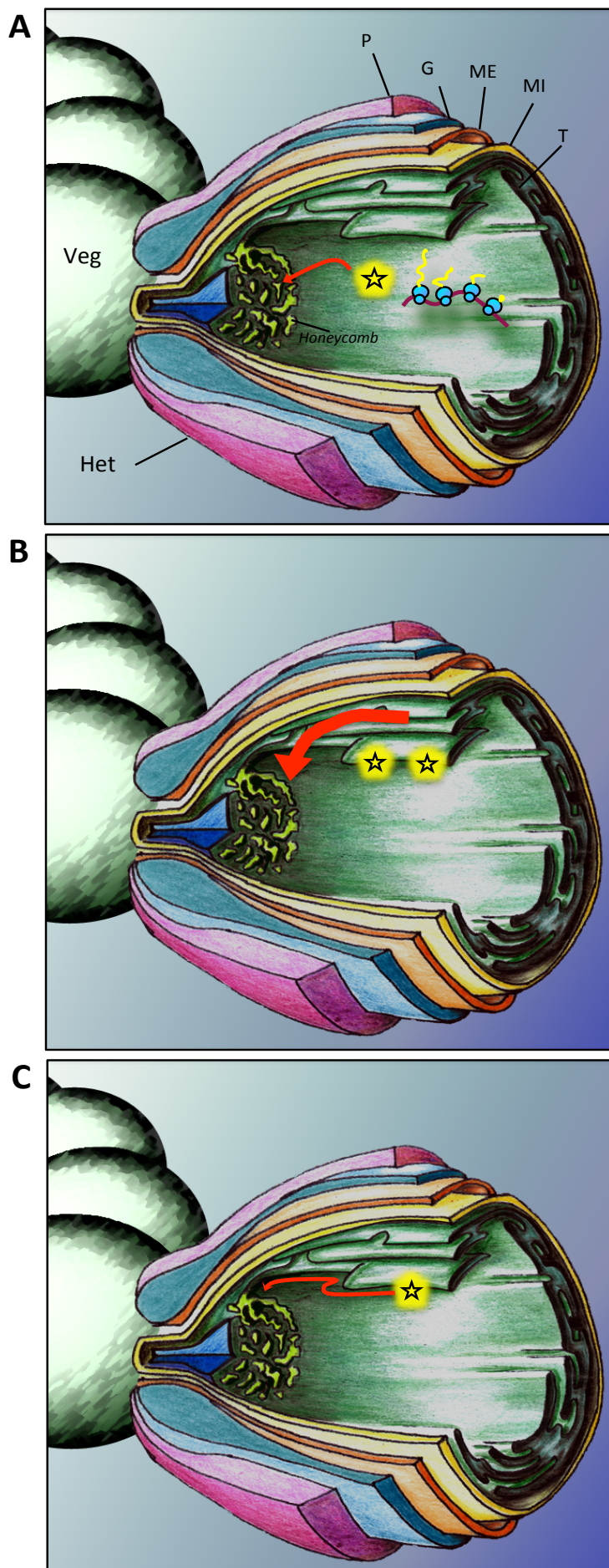


Figura 4.1.3.- Ilustración representativa de las hipótesis sobre el mecanismo de relocación de ValRS^C en el heterocisto de *Anabaena*.

(A) Hipótesis *a* sobre la inserción específica de proteína de nueva síntesis en las membranas de localización polar (*honeycomb*). *Veg*: célula vegetativa; *Het*: heterocisto; *P*: capa de polisacárido; *G*: capa de glicolípidos; *ME*: membrana externa; *MI*: membrana interna; *T*: tilacoides. Con una estrella amarilla se representa a la ValRS^C. En azul se representan los ribosomas traduciendo el mRNA (burdeos). La flecha roja indica la inserción de la proteína recién sintetizada en las membranas polares **(B)** Hipótesis *b* sobre el desplazamiento pasivo de ValRS^C. La flecha roja simboliza el movimiento de las membranas tilacoidales hacia el polo del heterocisto. **(C)** Hipótesis *c* sobre el desplazamiento activo de la ValRS^C en el plano de la membrana tilacoidal. La flecha roja simboliza el movimiento de ValRS^C hacia las membranas de localización polar.

Por otro lado se expresó la fusión GFP-CAAD desde el promotor *PhetN*, promotor específico de heterocistos que inicia su expresión en una fase intermedia del desarrollo, en torno a las 12 horas de la inducción de la diferenciación (Callahan & Buikema, 2001). Se esperaba que esto permitiese analizar el comportamiento de la proteína GFP-CAAD sintetizada *de novo* en las fases finales del desarrollo del heterocisto. Estas construcciones se integraron en el locus *nucA-nuiA* del genoma de *Anabaena* por recombinación simple. En estos experimentos se utilizaron como control estirpes de *Anabaena* que expresan la proteína GFP bajo los promotores *PsusA* o *PhetN*. La inducción del desarrollo de heterocistos se llevó a cabo privando a *Anabaena* de cualquier fuente de nitrógeno combinado del modo expuesto anteriormente.

Se analizó la fluorescencia de la proteína en la estirpe *PsusA*-GFP-CAAD previamente a la inducción y a las 6, 12, 18 y 24 horas tras la inducción de la diferenciación mediante microscopía confocal. Contrariamente a lo esperado, no se detectó fluorescencia en células vegetativas a lo largo del experimento. Sólo se detectó fluorescencia a las 24 h de la inducción, localizada en los polos de los heterocistos (Figura 4.1.4, primera fila de paneles), con una distribución subcelular similar a la de la proteína GFP-CAAD expresada desde el promotor del gen *patS* a las 24 h.

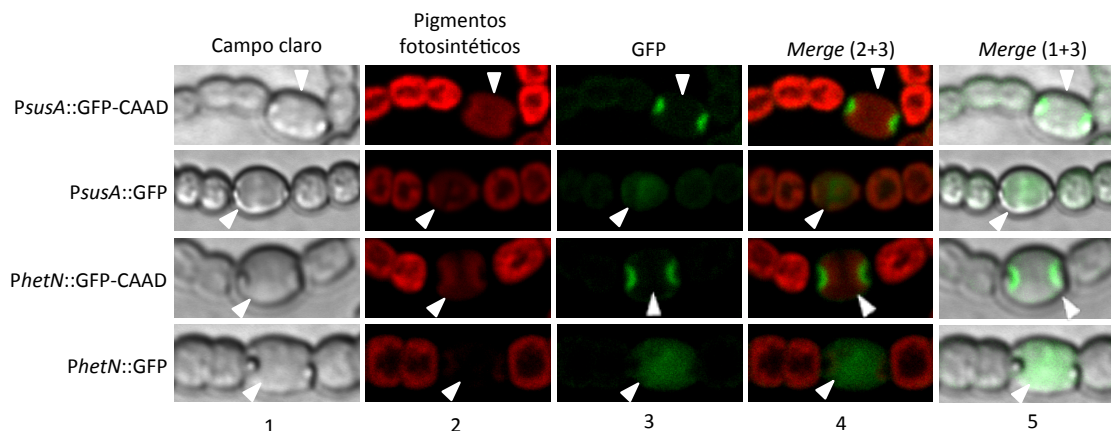


Figura 4.1.4.- Localización en el heterocisto de la proteína GFP-CAAD. Imágenes de microscopía confocal de filamentos de *Anabaena* expresando la proteína de fusión GFP-CAAD o la proteína GFP bajo el promotor del gen *susA* (dos paneles superiores) y del gen *hetN* (dos paneles inferiores). Los paneles 1 muestran la imagen de campo claro, los paneles 2 muestran la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos, los paneles 3 muestran la fluorescencia de la GFP, los paneles 4 representan la superposición de los paneles 2 y 3, y los paneles 5 muestran la superposición de los paneles 1 y 3. Las flechas blancas indican la posición del heterocisto.

Este resultado fue inesperado y muy sorprendente pues el patrón de expresión observado es opuesto al descrito (Curatti *et al.*, 2006). Dicho patrón de expresión también se observó con la construcción *PsusA*-GFP. Ambas construcciones se verificaron mediante secuenciación. Actualmente no encontramos una explicación satisfactoria para la discrepancia

de estos resultados con los publicados y parece prudente no aventurar interpretaciones del resultado hasta que no se dispongan de más datos.

En el caso de la proteína de fusión expresada desde el promotor *PhetN* sólo se observó señal en estadios más tardíos de la diferenciación (24 h) y ésta se distribuía en los polos del heterocisto (Figura 4.1.4, tercera fila de paneles) con una forma cóncava similar a la observada para la misma proteína expresada a partir del promotor *PpatS* a las 24 h de la inducción. Estos resultados sugieren que, al menos en heterocistos en avanzado estado de diferenciación, la proteína de nueva síntesis se inserta directamente en membranas de localización polar, lo que apoya la hipótesis *a*. Ello no implica sin embargo que en estadios más tempranos se pueda descartar el movimiento de la proteína GFP-CAAD como consecuencia de la redistribución de las membranas tilacoidales (hipótesis *b*), ni el movimiento autónomo de la proteína en la bicapa lipídica (hipótesis *c*). De hecho, algunas observaciones apoyan la existencia de una dinámica de GFP-CAAD independiente a la dinámica de membranas tilacoidales. Por ejemplo, la presencia de proteína GFP-CAAD en el cuello del heterocisto, en el que no se observa fluorescencia de membranas tilacoidales (Figura 4.1.1B, 18 horas; figura 4.1.2, 16 horas), así como la existencia de porciones de membrana tilacoidal libres de GFP-CAAD (Figura 4.1.4, primera y tercera fila de imágenes).

4.1.2.- Análisis de la recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo en el heterocisto de *Anabaena*

Con el objetivo de analizar más en profundidad la dinámica de la proteína GFP-CAAD en el heterocisto de *Anabaena*, se llevaron a cabo experimentos de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo o FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). El FRAP consiste en la destrucción fotoquímica de un fluoróforo, tras lo cual se monitoriza y cuantifica la recuperación de la fluorescencia a lo largo del tiempo, lo que proporciona información sobre el movimiento de la molécula fluorescente y la convierte en una técnica adecuada en estudios de dinámica de proteínas en sistemas biológicos (Mullineaux, 2004).

Los experimentos de FRAP se realizaron con la estirpe de *Anabaena* que expresa la fusión GFP-CAAD desde el promotor del gen *patS* utilizando células cultivadas durante 24 horas en condiciones diazotróficas. A las 24 horas de limitación de nitrógeno, los filamentos de *Anabaena* cuentan con heterocistos en distintos estados de maduración. Se observan heterocistos maduros, que presumiblemente iniciaron su diferenciación al comienzo del experimento, y otros en distintos estados de diferenciación que probablemente iniciaron la diferenciación posteriormente. Por tanto, en estos cultivos se observaban heterocistos

maduros en los que la proteína GFP-CAAD se localiza en la zona interna de los polos y otros en fases más tempranas de maduración en los que la proteína se localiza mayoritariamente en la periferia del citoplasma y, en ocasiones, en el cuello del heterocisto. En heterocistos maduros se realizó FRAP de uno de los polos, mientras que en proheterocistos se realizó FRAP de zonas cercanas al ecuador de la célula (Fig. 4.1.5). Sorprendentemente, se observó una gran diferencia entre la velocidad de recuperación de la fluorescencia en los polos del heterocisto y en la zona intermedia del proheterocisto. Mientras que en la zona intermedia se recuperaba el 30% de la fluorescencia inicial en 30 segundos (Figura 4.1.5B), en los polos eran necesarios 5 minutos hasta recuperar el 30% de la fluorescencia inicial (Figura 4.1.5A). Se analizó matemáticamente la dinámica de recuperación de la fluorescencia en la zona polar y en la zona intermedia y se comprobó que en ambos casos se aproximaba a una curva exponencial. Se calculó el coeficiente de recuperación de la fluorescencia aproximando los datos experimentales a una función exponencial, como se describe en el apartado 2.3.4.4.3. El coeficiente de recuperación de la proteína GFP-CAAD en la zona intermedia de los heterocistos fue de $0.0702 \pm 0.0116 \text{ s}^{-1}$ (media \pm la desviación estándar, $n=6$), mientras que en los polos el coeficiente de difusión fue de $0.00562 \pm 0.00117 \text{ s}^{-1}$ (media \pm la desviación estándar, $n=9$) (Figura 4.1.5C). El coeficiente de recuperación de la proteína GFP-CAAD en los polos del heterocisto es por tanto unas 10 veces inferior al que muestra en la zona intermedia. Como control se llevó a cabo un análisis FRAP de los ficobilisomas, que se asocian a la cara citoplásmica de la membrana tilacoidal y que se pueden monitorizar por su fluorescencia en el rojo (680 nm). Se comprobó que el tiempo de recuperación de la fluorescencia era similar en los polos y en la zona intermedia de la célula (Figura 4.1.5D y 4.1.5E, respectivamente). Se calculó el coeficiente de recuperación para los ficobilisomas en ambas zonas (Figura 4.1.5F), resultando en $0.0509 \pm 0.0028 \text{ s}^{-1}$ para los polos y $0.0572 \pm 0.0107 \text{ s}^{-1}$ para la zona intermedia (media de 4 y 6 experimentos independientes respectivamente \pm desviación estándar), y siendo en ambos casos comparable al de la proteína GFP-CAAD en la zona intermedia del heterocisto. Para estudiar si la recuperación de la fluorescencia observada en los polos se debía a redistribución de la proteína no fotoblanqueada procedente de otras regiones de la célula, a nueva síntesis de proteína o a la suma de ambos fenómenos, decidimos llevar a cabo experimentos de FRAP idénticos a los anteriores pero con la adición de un inhibidor de la síntesis proteica como el cloranfenicol. Para ello, se partía de células de una estirpe de *Anabaena* que expresa la proteína GFP-CAAD desde el promotor del gen *patS* cultivadas en condiciones diazotróficas durante 24 horas. Transcurrido este tiempo el cultivo se dividió en dos, uno de ellos permanecía creciendo en las mismas condiciones y al otro se añadía cloranfenicol a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$. Ambos cultivos se incubaron durante 2

horas en estas condiciones, tras lo cual se procedió al análisis FRAP de las zonas polares del heterocisto en el microscopio confocal.

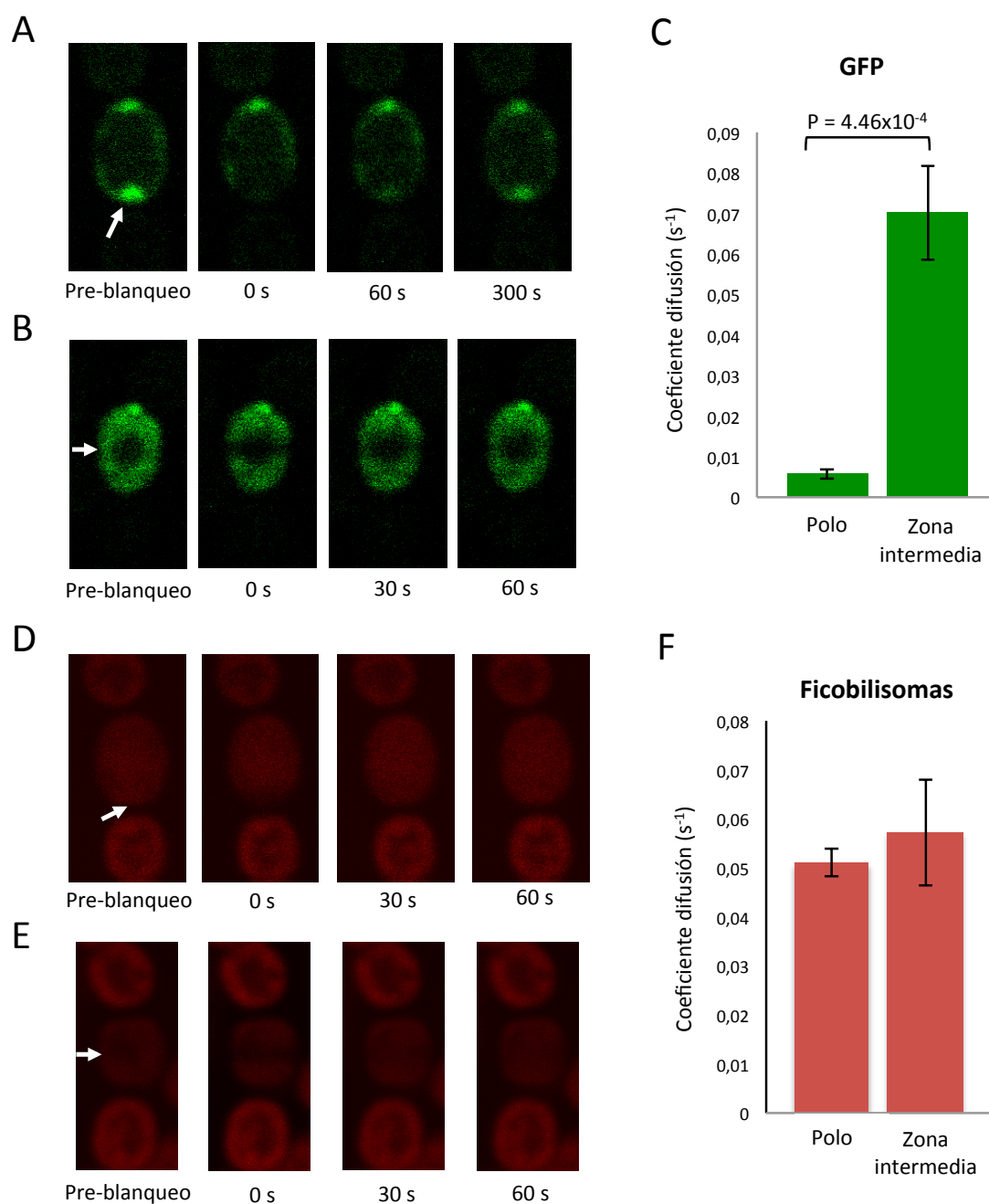


Figura 4.1.5.- Análisis FRAP en heterocistos de *Anabaena*. Imágenes de microscopio confocal sobre la evolución en la recuperación de la fluorescencia de la proteína GFP-CAAD en los polos (**A**) y en la zona intermedia del heterocisto (**B**); o de los ficobilisomas en los polos (**D**) y en la zona intermedia del heterocisto (**E**). El primer panel de cada serie de imágenes muestra la fluorescencia previa al fotoblanqueo; el segundo, la fluorescencia inmediatamente después del fotoblanqueo y el resto de paneles, la fluorescencia a los tiempos indicados abajo desde el fotoblanqueo. La flecha blanca señala la región fotoblanqueada. (**C** y **D**) Representación en forma de histograma del coeficiente de difusión de la proteína GFP-CAAD (**C**) y de los ficobilisomas (**D**) en los polos y la zona intermedia del heterocisto.

Se pudo comprobar que en presencia de cloranfenicol había recuperación de la fluorescencia, que correspondería exclusivamente a la redistribución de la proteína preexistente procedente de zonas de la célula que no han sido fotoblanqueadas. No obstante, la recuperación de la fluorescencia era menor en presencia del antibiótico, con un coeficiente de recuperación de $0.00305 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$ (media \pm desviación estándar, $n=4$), lo que supone un 46% menos de recuperación respecto a la observada en ausencia de cloranfenicol. Ello indica que en células no tratadas, la recuperación de la fluorescencia se debe en parte a la inserción de proteína de nueva síntesis en membranas de la región polar. De acuerdo con estos datos, la recuperación debida a redistribución supondría aproximadamente un 55% y la debida a síntesis *de novo* en torno al 45%.

4.2 DISCUSIÓN

La localización de ValRS^C en los heterocistos de *Anabena* difiere considerablemente de lo observado en las células vegetativas (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Por lo tanto, parece evidente que en paralelo a la metamorfosis que experimentan las células en proceso de diferenciación tiene lugar la relocalización de ValRS^C. En este trabajo se muestran resultados que apoyan que este fenómeno depende de la presencia del dominio CAAD, lo que corrobora observaciones anteriores (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Se ha estudiado el proceso de

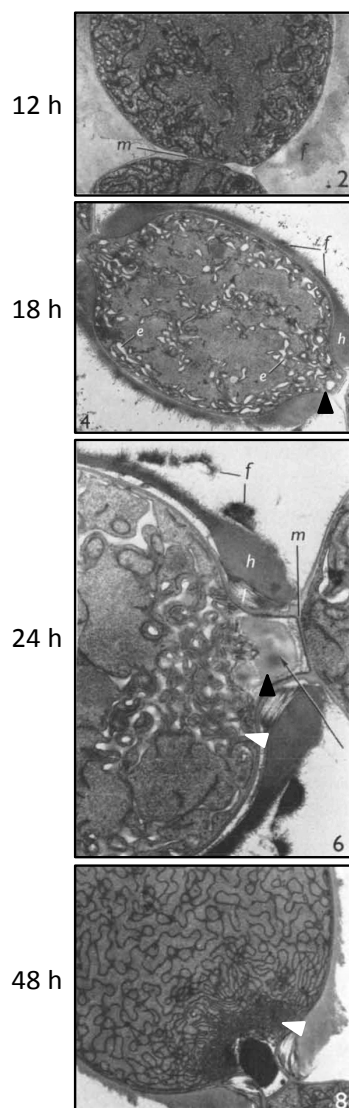


Figura 4.2.1.- Metamorfosis del heterocisto durante el proceso de diferenciación. Se observan los cambios en la morfología y ultraestructura de la célula a lo largo de la diferenciación. Los tiempos que se indican son aproximados. Adaptado de Wilcox *et al.*, 1973.

relocalización usando la proteína de fusión GFP-CAAD, que mimetiza el comportamiento de ValRS^C en cuanto a su distribución subcelular, y se ha determinado que la relocalización de la proteína con destino a los polos de la célula sigue una pauta secuencial en la que se distinguen varias etapas. Con el objetivo de dilucidar el mecanismo que gobierna este proceso, se plantearon tres hipótesis no excluyentes, las cuales se probaron mediante el análisis de la dinámica de la proteína GFP-CAAD expresada desde diferentes promotores. La expresión de la proteína de fusión a partir del promotor *PpatS*, un promotor temprano específico de heterocistos, ha permitido observar que la proteína mantiene su patrón de distribución subcelular típico de células vegetativas hasta las 12 horas del inicio de la diferenciación, momento en el que empieza a observarse cierta acumulación de proteína en los polos de la célula (Figura 4.1.1A). En este punto de la diferenciación las membranas tilacoidales del proheterocisto aún no han comenzado su redistribución (Figura 4.2.1, 12 horas), la cual tiene lugar típicamente en torno a las 20-24 horas desde el inicio de la diferenciación (Wilcox *et al.*, 1973; Omairi-Nasser *et al.*, 2014), lo que sugiere que la acumulación polar de la proteína durante esta etapa es independiente al desplazamiento de las membranas (hipótesis c). Tras 18 horas de diferenciación, la acumulación de proteína en ambos polos del heterocisto era cada vez más evidente (Figura 4.1.1A y 4.1.1B). En esta fase llama la atención que la proteína se localiza mayoritariamente en una zona muy cercana al septo que separa el heterocisto de

la célula vegetativa adyacente, ocupando el cuello del heterocisto. Precisamente es en este estado de la diferenciación cuando tiene lugar la formación del cuello (Figura 4.2.1, 18 horas, punta de flecha negra) (Wilcox *et al.*, 1973). Esta estructura, que resulta del estrechamiento del citoplasma y del engrosamiento de la capa de glicolípidos y polisacáridos, se caracteriza por un alargamiento del citoplasma en las zonas polares. Aunque parece evidente la existencia de membranas tilacoidales en el cuello del heterocisto (Figura 4.2.1, 18 horas, punta de flecha negra), la proteína GFP-CAAD se observa en zonas del cuello que carecen de la autofluorescencia típica de las membranas tilacoidales (Figura 4.1.1B, 18 horas; figura 4.1.2, 16 horas), una observación que de nuevo apoya la hipótesis del movimiento autónomo de la proteína. A las 24 horas del inicio de la diferenciación, la proteína desaparece de otras zonas de la célula y aparece únicamente en los polos, si bien abandona el cuello del heterocisto y se dispone de forma que parece rodear internamente los gránulos de cianoficina, coincidiendo con la localización de las membranas *honeycomb* (Figura 4.1.1A; 4.1.1B y 4.2.1, 24 horas, punta de flecha blanca) (Lang & Fay, 1971; Wilcox *et al.*, 1973). Aunque se desconoce el mecanismo por el que la proteína de los polos se internaliza entre las 18 y 24 horas de la diferenciación, el hecho de que es en este periodo cuando tiene lugar la formación del gránulo de cianoficina (Sherman *et al.*, 2000) (Figura 4.2.1, 24 horas, punta de flecha negra), induce a pensar que es la síntesis del gránulo junto con la formación de las membranas *honeycomb* lo que determina el cambio de localización de GFP-CAAD desde el cuello a la zona que rodea al gránulo de cianoficina. Ello favorecería la hipótesis *b* de una redistribución "pasiva" de GFP-CAAD, que durante este periodo se desplazaría junto a la membrana de la que forma parte empujada por el crecimiento del gránulo de cianoficina.

La expresión desde el *PhetN* informa del comportamiento de la proteína que se produce *de novo* en las etapas finales de la diferenciación. La observación de GFP-CAAD exclusivamente en los polos del heterocisto (Figura 4.1.4), sugiere que la proteína de nueva síntesis se integra directamente en las membranas de localización polar, lo que está de acuerdo con la hipótesis *a*. No obstante, mediante la técnica microscópica FRAP, se ha podido confirmar que la proteína es móvil en la membrana tilacoidal, pues se recupera la fluorescencia tras el fotoblanqueo de la GFP fusionada al dominio CAAD. Además, se presentan resultados que indican que la localización de la proteína en el polo resulta tanto del movimiento de la proteína preexistente (con una contribución del 55%) como de la inserción en las membranas polares de proteína de nueva síntesis (con una contribución del 45%). Los resultados obtenidos sugieren por tanto que la relocalización de GFP-CAAD es fruto de la inserción directa de proteína en las membranas polares, así como del movimiento de la proteína, ya sea de forma autónoma o como integrante de la membrana durante la migración

de éstas. Por tanto, no se puede descartar ninguna de las tres hipótesis planteadas, pues los resultados indican que la relocalización de la proteína hacia los polos del heterocisto ocurre por múltiples mecanismos.

Además, la técnica de FRAP nos ha permitido profundizar sobre algunos aspectos subyacentes a la dinámica de la proteína GFP-CAAD en el heterocisto de *Anabaena*. Mediante esta técnica analizamos el movimiento de la proteína en heterocistos con diferente grado de maduración. Así, pudimos comprobar que la recuperación de la fluorescencia de la GFP era 10 veces más rápida en las zonas ecuatoriales de la célula que en los polos, siendo la velocidad de la proteína en los tilacoides de la zona ecuatorial comparable a la de un complejo extrínseco de membrana como el ficobilisoma, que a pesar de su tamaño difunde rápidamente asociado a la cara citoplasmática del tilacoide (Figura 4.1.5) (Mullineaux *et al.*, 1997; Joshua & Mullineaux, 2004; Mullineaux, 2014). Se ha comprobado que la recuperación de la fluorescencia en los polos se debe en parte a la redistribución de proteínas desde membranas situadas en otras regiones de la célula. Las diferencias observadas en la dinámica de GFP-CAAD entre el ecuador y el polo del heterocisto sugieren la existencia de algún factor que limita el movimiento de la proteína en el polo. Una posible explicación a este fenómeno podría ser la existencia de algún factor en el polo del heterocisto que se une fuertemente al dominio CAAD limitando así la libre difusión de la proteína. Por otra parte, podrían existir diferencias en la naturaleza o en las características fisicoquímicas de las membranas del polo y de las zonas no polares que afectarían de forma diferencial a la dinámica de la proteína (Nagy *et al.*, 2011; Liberton *et al.*, 2013; Mullineaux, 2014). Además, se conoce que la alta concentración de membranas en los polos del heterocisto, sumado a la gran densidad molecular presente en estas membranas, limitan en gran medida la movilidad de las proteínas de membrana tilacoidal (Kirchhoff *et al.*, 2008; Kaňa, 2013). Finalmente, no se puede descartar la posibilidad de que no existan conexiones entre las membranas *honeycomb* y las membranas tilacoidales de otras zonas de la célula. De ser así, el único mecanismo de redistribución de proteínas de una membrana a otra sería el intercambio de vesículas entre membranas, un fenómeno del que aún se desconocen muchos detalles en cianobacterias (Schneider *et al.*, 2007; Hennig *et al.*, 2015).

Las proteínas que experimentan una relocalización en células eucariotas son numerosas. En bacterias sin embargo, los casos de proteínas que cambian de localización son menos conocidos. Ello obedece a la menor complejidad de la célula procariota y a que hasta recientemente no se ha dispuesto de los avances técnicos necesarios para analizar con facilidad estos fenómenos en células del tamaño de las bacterias. No obstante algunos casos de relocalización de proteínas en bacterias están bien caracterizados (Shapiro *et al.*, 2009). Ampliamente conocidos son los fenómenos de relocalización de las proteínas MinC y MinD de

muchas bacterias Gram-negativas que oscilan de forma cíclica entre los polos de la célula para prevenir la división celular y la formación del anillo de FtsZ hasta que la célula alcanza la longitud adecuada (Hu *et al.*, 1999; Raskin & de Boer, 1999; Shih & Zheng, 2013), el de las proteínas ParA y ParB que se localizan en los polos de la célula desde donde median la correcta segregación cromosómica en la mayoría de bacterias (Bartosik *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Mignot & Shaevitz, 2008), o el de las proteínas FrzS y RomR de *Myxococcus xanthus*, implicadas en la motilidad celular mediante un proceso estrictamente regulado en el que van oscilando de polo a polo de la célula para determinar la dirección del movimiento (Blackhart & Zusman, 1985; Mignot *et al.*, 2005). También las proteínas de control del ritmo circadiano de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 CikA, KaiA y KaiC cambian de localización cíclicamente, localizándose durante la noche en uno de los polos de la célula (Zhang *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2014). No obstante, todos estos fenómenos de relocalización son cíclicos y reversibles. En cambio la relocalización de GFP-CAAD, mediada por el dominio CAAD, es un fenómeno irreversible que cursa en paralelo a un proceso de diferenciación celular y constituye un modelo ideal para el estudio de la relocalización de proteínas de membrana en cianobacterias.

La redistribución de las membranas intracitoplásmicas durante la diferenciación del heterocisto es un fenómeno bien documentado en *Anabaena* sp. PCC 7120 y especies cercanas (Wilcox *et al.*, 1973; Omairi-Nasser *et al.*, 2014; Giddings & Staehelin, 1979), si bien se desconoce si esta redistribución obedece a la migración de las membranas preexistentes, a la síntesis de nuevas membranas intracitoplásmicas o a ambos fenómenos. La diferenciación también lleva consigo un cambio en el proteoma de estas membranas, produciéndose la pérdida parcial de componentes del fotosistema II y una remodelación notable de los ficobilisomas (Magnuson & Cardona, 2016). Respecto a la génesis de las membranas *honeycomb*, se desconoce si éstas derivan de la transformación de las membranas tilacoidales presentes en el proheterocisto o si se forman por nueva síntesis de membrana. Algunas evidencias indican que la composición proteica de las membranas *honeycomb* difiere de la de las membranas tilacoidales de otras partes de la célula, mostrando un enriquecimiento en actividad respiratoria (Murry *et al.*, 1981) y PSI (Kumazaki *et al.*, 2013). Esto ha llevado a proponer que las membranas *honeycomb* forman un dominio funcional distinto y que su alta actividad metabólica en las zonas polares puede estar relacionada con el intenso tráfico de moléculas que tiene lugar entre el heterocisto y las células vegetativas vecinas a través del septo (Magnuson & Cardona, 2016; Herrero *et al.*, 2016). FraH es una proteína necesaria para la formación de las membranas *honeycomb* en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Merino-Puerto *et al.*, 2011a). Es interesante destacar que FraH es el único ejemplo conocido hasta la fecha de una

proteína que se comporta de manera análoga a ValRS^C ya que cambia de localización durante la diferenciación, ocupando en heterocistos maduros una posición similar a la de ValRS^C, que coincide a su vez con la localización de las membranas *honeycomb*. No obstante, a diferencia de ValRS^C, FraH se localiza de forma periférica en células vegetativas en lo que parece ser la membrana plasmática (Merino-Puerto *et al.*, 2011a). Interesantemente, FraH sigue un patrón de distribución helicoidal en la célula vegetativa que evoca al de la proteína del citoesqueleto procariota MreB (Jones *et al.*, 2001), lo que podría relacionar este proceso de relocalización con el citoesqueleto de *Anabaena*.

En este trabajo se han aportado resultados que arrojan luz sobre los mecanismos moleculares que gobiernan el proceso de la relocalización de ValRS^C en el heterocisto. Aunque aún se desconocen muchos detalles, es probable que la finalidad de este fenómeno sea la de posicionar dicha proteína en una región de alta actividad metabólica y de gran intercambio de metabolitos (Mullineaux *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2016), lo cual podría favorecer su actividad en el heterocisto.

5

CAPÍTULO III

**Análisis funcional del operón de genes de tRNAs del
plásmido delta de *Anabaena***

5.1 RESULTADOS

Análisis funcional del operón de genes de tRNAs del plásmido delta de *Anabaena*

Anabaena posee en su genoma una dotación completa de genes *trn*, que codifican para tRNAs, suficientes para descodificar los 61 codones del código genético. Además, *Anabaena* cuenta en su plásmido delta con un agrupamiento de 26 genes *trn* (de los que 5 son posibles pseudogenes) organizados en tándem y con estrechos espacios intergénicos (Puerto-Galan & Vioque, 2012). Este agrupamiento de genes forma un operón (en adelante operón *trn*) que se transcribe en un RNA policistrónico de corta vida media, que es rápidamente procesado dando lugar a los tRNAs maduros (Puerto-Galan & Vioque, 2012). Aunque se ha demostrado que algunos de los tRNAs codificados en el operón se aminoacilan *in vivo*, su bajo nivel de expresión (órdenes de magnitud inferior al de los tRNAs codificados en el cromosoma) junto con el fenotipo silvestre de un mutante carente del operón, plantea la cuestión de si éste cumple alguna función en la célula o si como se ha sugerido se trata de un vestigio evolutivo en vías de desaparición (Puerto-Galan & Vioque, 2012). En esta parte del trabajo se pretende investigar si el operón *trn* tiene alguna función en las células de *Anabaena*.

5.1.1.- Consecuencias fisiológicas de la expresión de los tRNAs del operón *trn*

Con objeto de indagar en la posible función de los tRNAs del operón *trn* se generó una estirpe que lo expresa bajo el control de un promotor regulable. Para ello, se introdujo mediante recombinación simple la *cassette* de resistencia a antibióticos C.S3 junto con el promotor sintético P_{ND} (Ramos-Leon *et al.*, 2015) aguas arriba del operón *trn* (Figura 5.1.1A). Se seleccionaron algunos exconjugantes resistentes a estreptomicina y espectinomycin en los que se comprobó la segregación de la mutación mediante PCR (Figura 5.1.1B). Al amplificar con los oligonucleótidos representados en negro en la figura 5.1.1A, se comprobó la integración de la construcción en el genoma de *Anabaena*. Todos los clones analizados presentaban la banda de 0.75 Kb esperada en caso de inserción de la construcción (Figura 5.1.1B, panel de la izquierda), mientras que en el control negativo en el que se usa DNA de la estirpe silvestre como molde la banda de 0.75 Kb estaba ausente. Por otro lado, en ninguno de los clones analizados se amplificó una banda de 1.6 Kb correspondiente al fragmento silvestre (Figura 5.1.1B, panel de la derecha), que si se observó cuando se utilizaba biomasa de la estirpe silvestre como control, lo que indica la ausencia de cualquier copia silvestre de plásmido delta en los exconjugantes analizados. Tres clones independientes, que se denominaron JS75-1, JS75-2 y JS75-3, fueron seleccionados para posteriores análisis.

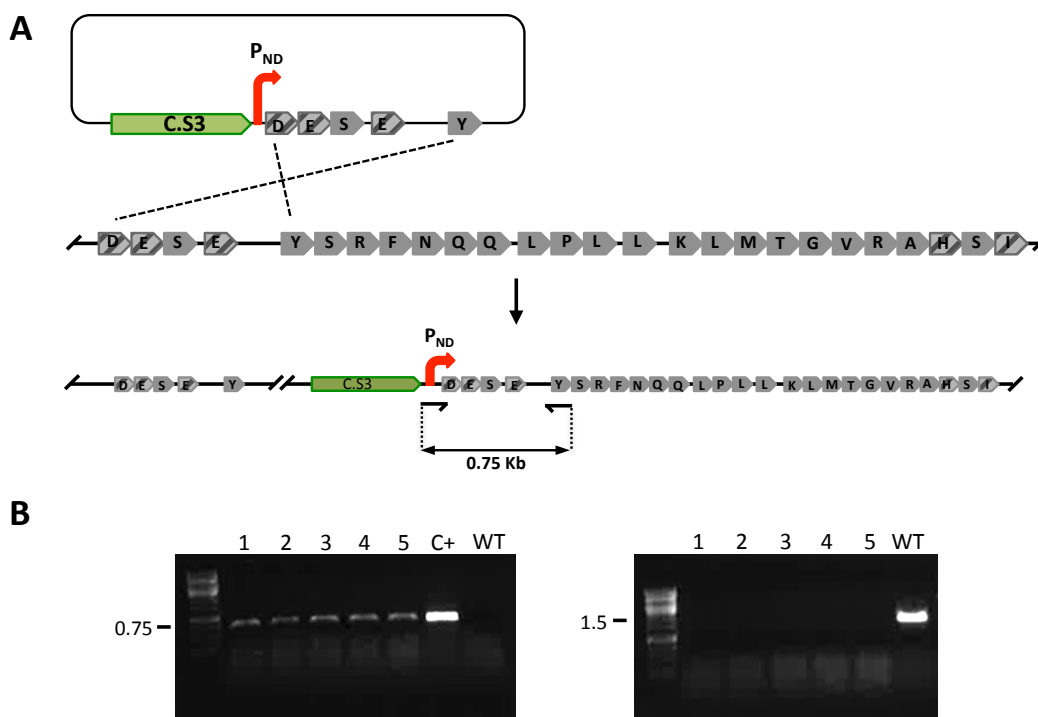


Figura 5.1.1.- Comprobación de la estructura cromosómica del mutante JS75 . (A) Representación esquemática de la recombinación que se espera que tenga lugar al introducir el plásmido pCJS75 en *Anabaena*. Los genes *trn* del operón se representan en gris, mientras que los posibles pseudogenes se representan en gris rayado. La letra mayúscula hace referencia a la identidad del aminoácido para el que descodifica cada tRNA. En negro se indican los oligonucleótidos empleados para la reacción de PCR de comprobación de la integración así como el tamaño esperado del amplicón. **(B)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para la comprobación de la integración (panel de la izquierda) o para la comprobación de la segregación (panel de la derecha). Como molde se empleó biomasa de cinco clones resistentes a estreptomycin y espectinomycin (clones 1, 2, 3, 4 y 5), biomasa de *Anabaena* silvestre (WT) o el plásmido pCJS75 utilizado para la conjugación (C+). A la izquierda de cada panel se señalan las posiciones del marcador de peso molecular de DNA (en Kb).

En los mutantes JS75 la expresión del operón *trn* está controlada por el promotor P_{ND} , que responde a la fuente de nitrógeno disponible (Herrero *et al.*, 2004), de manera que se puede modular la expresión de los tRNAs del operón según la fuente de nitrógeno que se suministra. Se analizó la expresión del operón en *Anabaena* silvestre y en el mutante JS75-1, ambos cultivados en diferentes fuentes de nitrógeno, mediante northern blot*.

En la estirpe silvestre el nivel de expresión de los tRNAs del operón es muy bajo, casi indetectable, e invariable en las distintas condiciones ensayadas (Figura 5.1.2).

* En los ensayos de northern blot que se presentan en este trabajo se utilizan preparaciones de RNA de dos clases según el tipo de RNA a analizar: para el estudio de tRNAs, se emplean preparaciones de RNA pequeño extraído con trizol (véase el apartado 2.3.2.1B), mientras que para el análisis de mRNA se utiliza RNA total extraído con fenol caliente (véase apartado 2.3.2.1A).

Ante la imposibilidad de utilizar genes normalizadores ampliamente aceptados como el gen 5S (que cifra para el rRNA 5S) o el gen *rnpB* (que codifica para el componente RNA de la RNasa P), debido en un caso a la alta variabilidad en la expresión observada para el gen 5S en muchas de las condiciones probadas en este trabajo y, en el otro caso, a la incompatibilidad del método de extracción de RNA con la presencia de transcritos del gen *rnpB*, se ha decidido, en base a la invariabilidad observada en su expresión, emplear el gen *trnM_i* de *Anabaena* como gen normalizador en todos los experimentos de northern blot que aparecen en esta memoria. El gen *trnM_i* codifica para el tRNA^{Met} iniciador y se localiza en el cromosoma de *Anabaena*. Además, como control de carga, se presentan los geles de agarosa empleados en los experimentos de northern blot.

En el mutante JS75 en cambio, se observaron en todas las condiciones bandas de hibridación del tamaño esperado para un tRNA maduro (75-100 nt) de una intensidad considerablemente mayor a la del silvestre. De acuerdo al patrón esperado, la intensidad de estas bandas era de aproximadamente el doble en el cultivo de nitrato respecto al de amonio y unas 4 veces superior en el cultivo en condiciones diazotróficas.

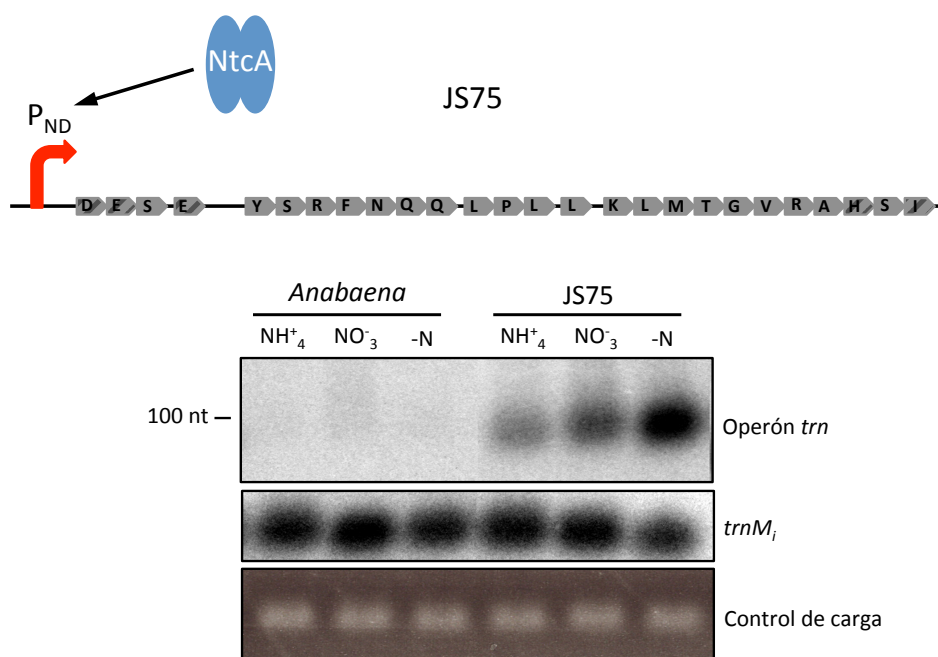


Figura 5.1.2.- Análisis de la expresión de los tRNAs del operón en el mutante JS75. Ensayo de northern blot con 2 µg de RNA pequeño procedente de células de *Anabaena* silvestre y del mutante JS75 cultivadas durante 24 horas en ausencia de nitrógeno combinado (-N), en presencia de nitrato (NO₃⁻) o en presencia de amonio (NH₄⁺) como fuente de nitrógeno. Los RNAs se hibridaron con una sonda del operón *trn*. A la izquierda se indica la posición del marcador de RNA de 100 nucleótidos. Debajo de la membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM₁* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

5.1.1.1.- Análisis del fenotipo de la estirpe JS75

5.1.1.1.1.- Composición de pigmentos

Un rasgo evidente de los mutantes JS75 era la diferente coloración de sus cultivos respecto a los del silvestre en cualquiera de las condiciones de nitrógeno ensayadas (Figura 5.1.3). Las diferencias en cuanto a pigmentación eran más acusadas en condiciones diazotróficas en las que el nivel de expresión de los tRNAs es más alto. En estas condiciones también se observaba un retraso en el crecimiento del mutante respecto al silvestre.

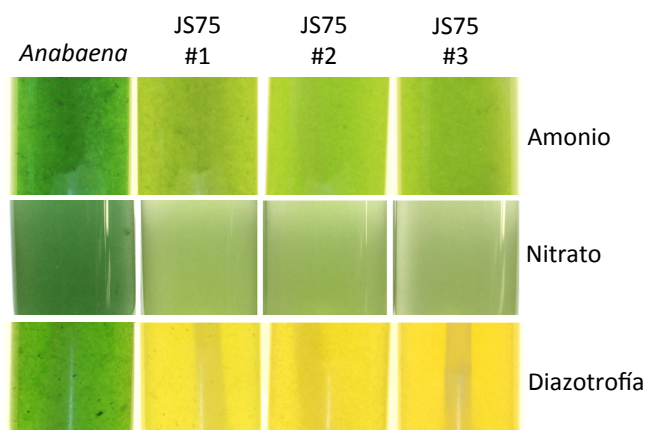


Figura 5.1.3.- Pigmentación de cultivos de *Anabaena* y del mutante JS75. Fotografías de cultivos de *Anabaena* silvestre y de los mutantes JS75-1, JS75-2 y JS75-3 creciendo en medio BG11 con amonio, nitrato o en condiciones diazotróficas.

Para analizar esas diferencias, se monitorizó la absorbancia en el espectro visible (350-750 nm) de extractos de células cultivadas en amonio y en condiciones diazotróficas, ya que es en estas condiciones donde se observan mayores diferencias de expresión del operón *trn* en el mutante JS75. Se analizaron tres clones independientes (JS75-1, JS75-2 y JS75-3) para los que se observaron resultados idénticos. En la figura 5.1.4A se muestra un ejemplo representativo de los espectros obtenidos. Se observa distinta proporción relativa de pigmentos en las estirpes silvestres y mutante tanto en amonio como en diazotrofia, si bien en estas últimas condiciones las diferencias son más acusadas, observándose que el pico correspondiente a ficobiliproteínas es muy bajo en la estirpe mutante, en consistencia con el color amarillento de sus cultivos.

Para cuantificar la variación relativa de los pigmentos se midió el contenido de clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas (apartado 2.3.4.1) en células de *Anabaena* silvestre y del mutante JS75 cultivadas en amonio y en diazotrofia (Figura 5.1.4B). Se observó que en ambas condiciones de cultivo el contenido de carotenoides era el mismo para las dos estirpes. Sin embargo, en amonio el contenido de clorofila del mutante JS75 era un 15% menor que el del silvestre y un 42% menor en condiciones diazotróficas. Por otro lado, el contenido en ficobiliproteínas del mutante era un 38% menor que el del silvestre en amonio y un 70% menor en diazotrofia. Existe por tanto una correlación entre el nivel de expresión del operón *trn* y las diferencias en contenido de clorofila y ficobiliproteínas respecto al silvestre.

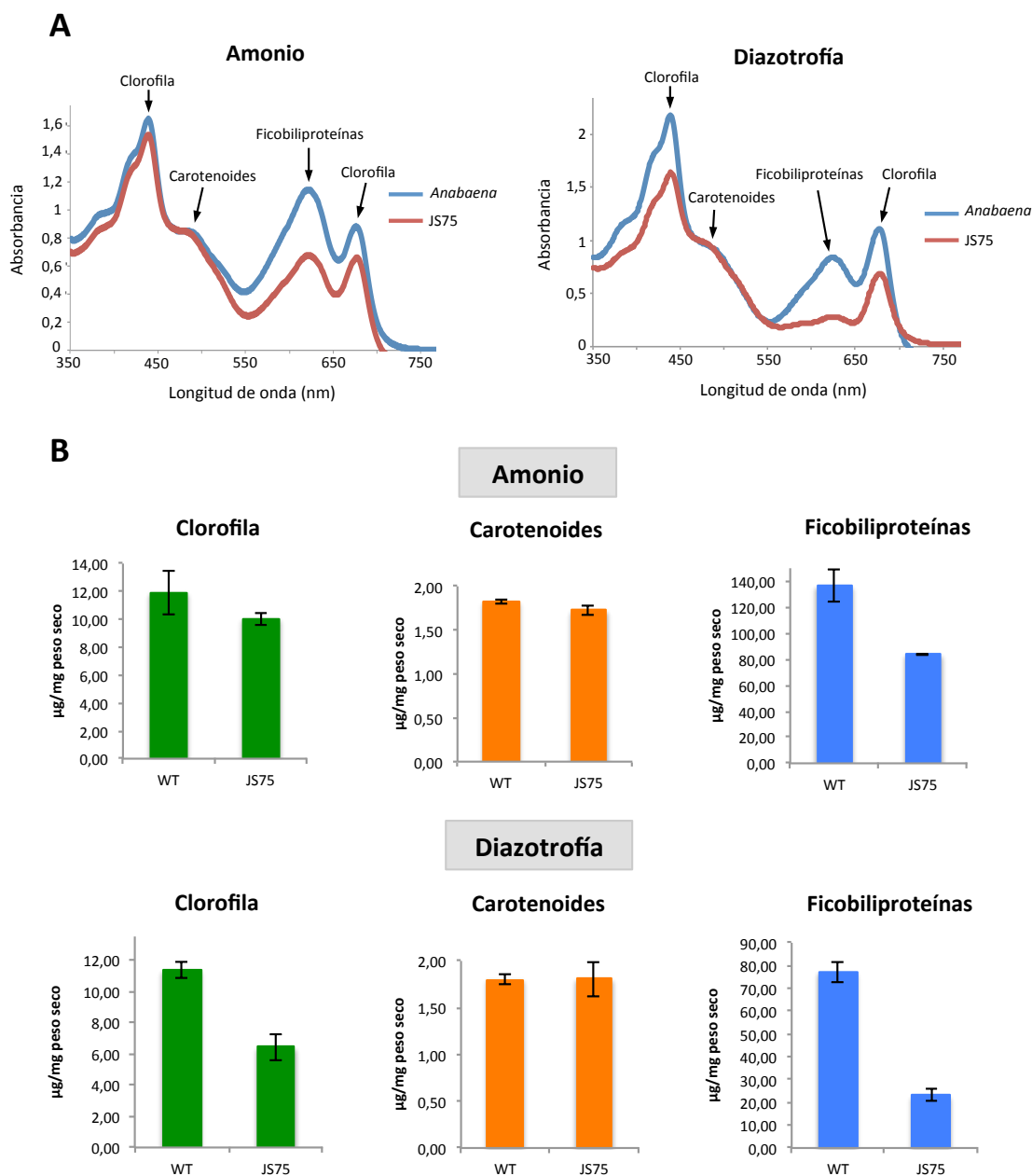


Figura 5.1.4.- Espectro de absorbancia y medida de pigmentos de *Anabaena* y el mutante JS75. (A) Espectros de absorbancia de extractos celulares de *Anabaena* silvestre (línea azul) y del mutante JS75 (línea roja) cultivados con amonio como fuente de nitrógeno (espectro de la izquierda) o en condiciones diazotróficas (espectro de la derecha). Se indican los picos de absorbancia correspondientes a cada pigmento. (B) Medidas de la concentración de clorofila (verde), carotenoides (naranja) y ficobiliproteínas (azul) en células de *Anabaena* silvestre (WT) y el mutante JS75 cultivadas en amonio y diazotrofia.

Para distinguir si el déficit de ficobiliproteínas del mutante JS75 se debía a la inhibición de su síntesis o a un incremento en su degradación, se analizó la expresión de *nbIA* cuya inducción determina la degradación de los ficobilisomas (Collier & Grossman, 1994). *nbIA* codifica para una pequeña proteína de 7 KDa que etiqueta los ficobilisomas para su degradación (Luque *et al.*, 2003; Karradt *et al.*, 2008; Sendersky *et al.*, 2014). En el genoma de *Anabaena* existen dos genes *nbIA*, uno de ellos (*asr4517*) se localiza en el cromosoma mientras

que el otro (*asr8504*) se encuentra en el plásmido delta de *Anabaena*. Se analizó mediante northern blot el nivel de transcrito de ambos genes en células de *Anabaena* silvestre y del mutante JS75 cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.1.5.

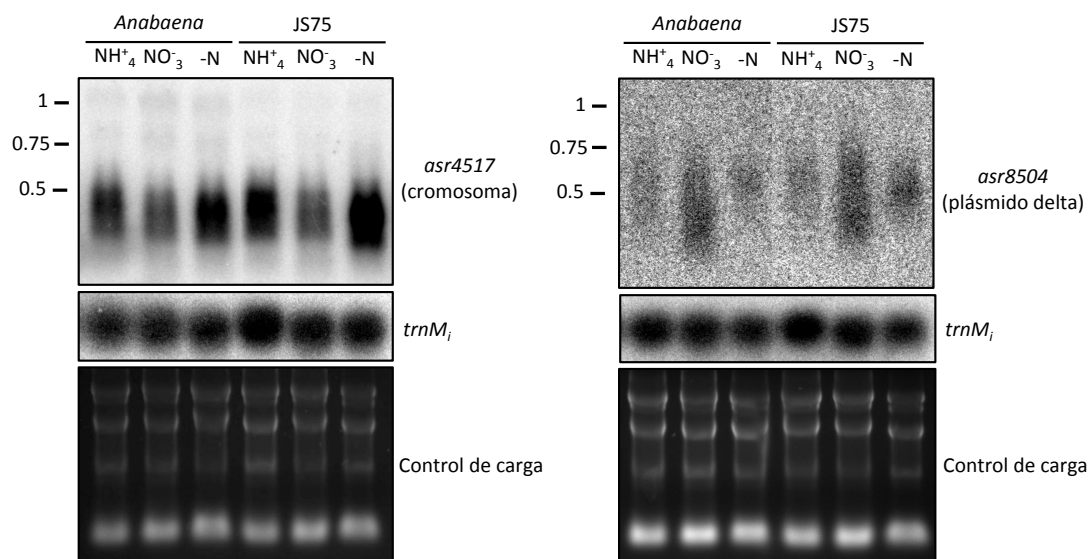


Figura 5.1.5.- Análisis de la expresión de *asr4517* y *asr8504* en *Anabaena* y el mutante JS75. Ensayo de northern blot con 10 µg de RNA total procedente de células de *Anabaena* silvestre y del mutante JS75 cultivadas durante 24 horas en presencia de amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻) como fuente de nitrógeno, y en ausencia de nitrógeno combinado (-N). A la derecha de cada panel se especifica la sonda utilizada en cada ensayo. A la izquierda se indica las posiciones del marcador de peso molecular de RNA (en Kb). Debajo de cada membrana se muestran las hibridaciones con el gen *trnM_i* usado como normalizador así como el gel de agarosa empleado como control de carga.

Los niveles de transcrito del gen *asr4517* eran ligeramente superiores en el mutante JS75 respecto al silvestre (Figura 5.1.5, panel izquierdo). Si bien, el patrón de expresión observado fue el mismo para ambas estirpes, lo que no apoya la existencia de una relación directa entre la expresión de los tRNAs del operón y *asr4517*. En el caso del gen *asr8504* se observaron niveles de expresión similares en ambas estirpes y muy bajos en todas las condiciones ensayadas (Figura 5.1.5, panel derecho). Estos resultados no permiten establecer una relación directa entre la expresión de los genes *nblA* y el bajo contenido en ficobiliproteínas de la estirpe JS75.

5.1.1.1.2- Sensibilidad a aminoácidos

Se analizó la secuencia y estructura de los tRNAs codificados en el operón *trn* mediante comparación con las secuencias de los tRNA isoaceptores codificados en el cromosoma mediante análisis de su estructura usando el *software* ARAGORN y tRNAscan-SE 1.21 (Laslett &

Canback, 2004; Schattner *et al.*, 2005). Se comprobó que algunos tRNAs codificados en el operón divergían en secuencia y estructura respecto a los isoaceptores codificados en el cromosoma. En la figura 5.1.6 se muestran como ejemplo las diferencias de secuencia y estructura observadas entre los tRNAs^{Leu} codificados en el cromosoma y en el operón *trn*.

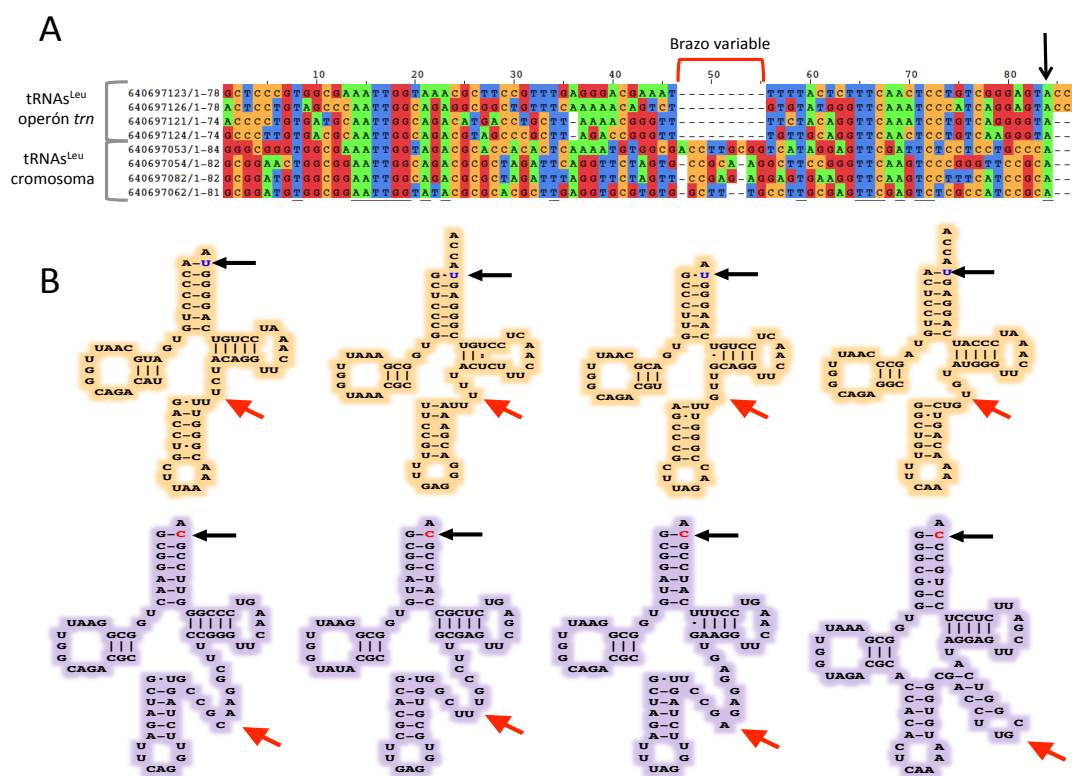


Figura 5.1.6.- Análisis de la secuencia y estructura secundaria de los tRNAs de leucina de *Anabaena*. (A) Alineamiento de secuencia de los tRNAs^{Leu} codificados en el genoma de *Anabaena* mediante ClustalW2. Se indica en rojo la posición del brazo variable y, mediante una flecha negra, el nucleótido de la posición 72. (B) Predicción de estructura secundaria elaborada con el software ARAGORN. En naranja se representan los tRNAs^{Leu} codificados en el operón del plásmido δ y en violeta los del cromosoma. Las flechas de color negro y rojo indican la posición del par G1:C72 y el brazo variable, respectivamente.

Destaca que los tRNAs^{Leu} del operón tienen un brazo variable muy corto y carecen del par G1:C72, que sí está presentes en los tRNAs^{Leu} del cromosoma. Estas diferencias llevaron a considerar que algunos de estos tRNAs podrían ser reconocidos por una aaRS no legítima y ser cargados con un aminoácido que no corresponde a su anticodón (Giegé *et al.*, 1998). De ser así, se introducirían mutaciones en la secuencia de proteínas durante la traducción. La puesta en evidencia de este fenómeno depende de su magnitud y puede no ser fácil. Una forma de poner de manifiesto fenómenos de mal-acilación de tRNAs y traducción ambigua es el cultivo de células en medio con una composición desbalanceada de aminoácidos. Puesto que las cianobacterias sintetizan los 20 aminoácidos proteínogénicos, se decidió cultivar *Anabaena* silvestre y el mutante JS75 en medio con concentraciones *quasi*-tóxicas de cada aminoácido.

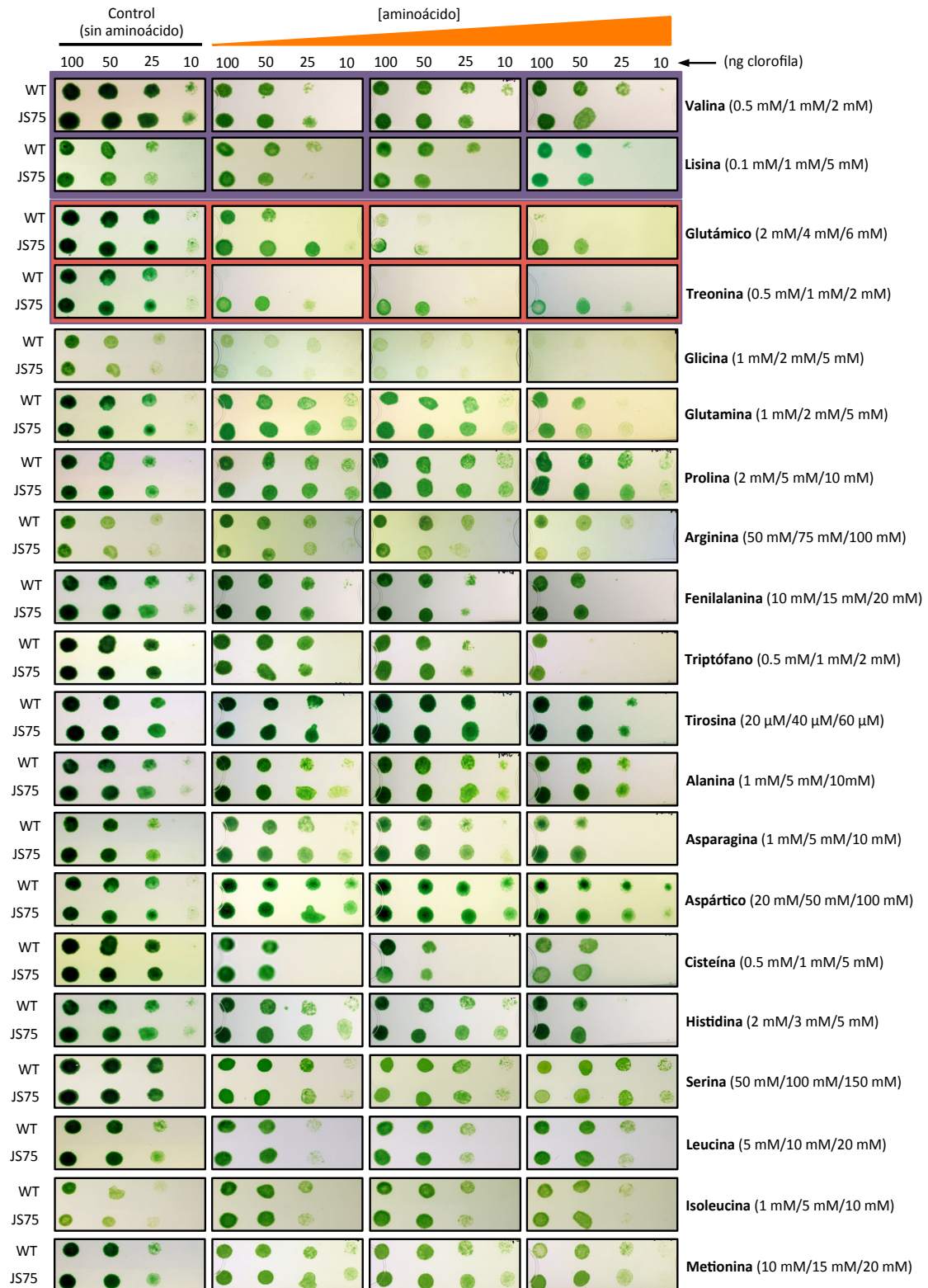


Figura 5.1.7.- Crecimiento de *Anabaena* silvestre y el mutante JS75 en medio sólido con concentraciones *quasi*-tóxicas de aminoácidos. Diluciones seriadas de cultivos de la estirpe silvestre de *Anabaena* (WT) y del mutante JS75 se sembraron en placas de BG11 (control sin aminoácidos) y en placas de BG11 suplementadas con distintas concentraciones de aminoácidos. Los números de la parte superior indican los ng de clorofila en cada gota. A la derecha de cada panel se especifica el aminoácido con el que se suplementa cada serie de placas y, entre paréntesis, las tres concentraciones de aminoácido utilizadas en cada una de las tres placas de cada serie.

Estos experimentos se realizaron en medio BG11 (nitrato como fuente de nitrógeno), en el que el promotor P_{ND} muestra un nivel intermedio de expresión y no se observan diferencias en cuanto a crecimiento entre la estirpe silvestre y JS75. En la figura 5.1.7 se muestra para cada aminoácido un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes.

De los 20 aminoácidos, únicamente se observaron diferencias de crecimiento cuando se suplementó con cuatro de ellos. En todos los ensayos la adición de valina y lisina al medio provocó un retraso en el crecimiento del mutante JS75 respecto a la estirpe silvestre (paneles sobre fondo violeta). Estos resultados podrían sugerir que alguno de los 26 tRNAs del operón se mal-acila con valina o lisina, de manera que un exceso de estos aminoácidos en el medio de cultivo exacerba este fenómeno produciendo toxicidad en el mutante JS75.

Sorprendentemente, cuando se suplementaba el medio con ácido glutámico o treonina, el mutante JS75 se veía favorecido en el crecimiento respecto a la estirpe silvestre (paneles sobre fondo rojo). De hecho, la presencia de treonina a concentraciones superiores a 0.5 mM es tóxica para la estirpe silvestre. Aunque este resultado no es fácil de interpretar, pone de manifiesto una diferencia fenotípica clara entre el silvestre y el mutante JS75.

5.1.2.- Análisis de la expresión del operón *trn*

Los resultados anteriores indican que la expresión del operón *trn* por encima de su nivel basal tiene consecuencias fisiológicas que dan lugar a un fenotipo pleiotrópico. Ello sugiere que este operón podría tener alguna función en *Anabaena*, aunque dado que hasta ahora no se ha detectado expresión por encima de su nivel basal, las observaciones anteriores podrían ser un mero artefacto producto de nuestra manipulación, que nunca ocurriría *in vivo*. Se decidió por tanto explorar si la expresión del operón *trn* se induce en condiciones específicas.

5.1.2.1.- Análisis de la expresión del operón *trn* en respuesta al estrés lumínico

Puesto que la luz es esencial para el crecimiento de *Anabaena*, se analizó el nivel de expresión del operón *trn* en cultivos de *Anabaena* con diferentes intensidades de luz, incluyendo condiciones de estrés lumínico ($1000 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$). Se observó de forma repetitiva que al transferir un cultivo creciendo en condiciones estándar ($100 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) a condiciones de alta luz (750 ó $1000 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$), los niveles de expresión del operón *trn* disminuían ligeramente a las 6 horas de cultivo y más notablemente (en un factor de 6) a las 24 h (Figura 5.1.8).

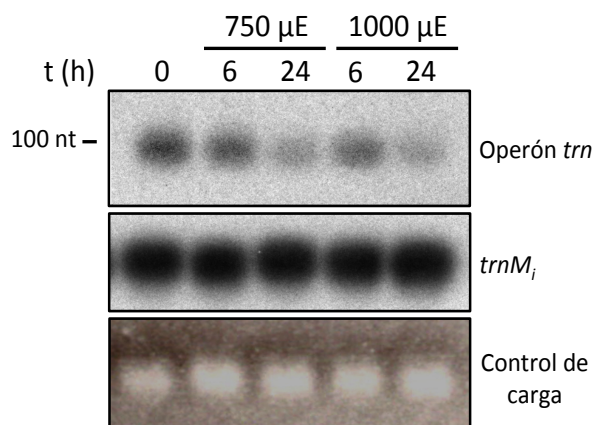


Figura 5.1.8.- Expresión del operón *trn* en respuesta a diferentes intensidades de luz. Células de *Anabaena* silvestre se cultivaron en BG11 a una intensidad de luz de 100 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, se tomó una alícuota que sirvió de referencia (t_0) y se dividió el cultivo en dos. Uno de ellos se expuso a luz blanca de 750 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ de intensidad y otro a luz blanca de 1000 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ durante 24 horas, tomándose alícuotas a los tiempos indicados (en horas) en la parte superior del panel. Se extrajo RNA y se hibridaron 2 μg de RNAs pequeños con una sonda del operón *trn*. A la izquierda se indica la posición del marcador de 100 nucleótidos. Debajo de la membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM_i* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

También se analizó la expresión de los tRNAs del operón en oscuridad (Figura 5.1.9). Se observó que la intensidad de la señal disminuía a la mitad del nivel inicial tras 72 horas en condiciones de oscuridad. De estos experimentos se dedujo que la expresión del operón *trn* no se induce por cambios en las condiciones lumínicas.

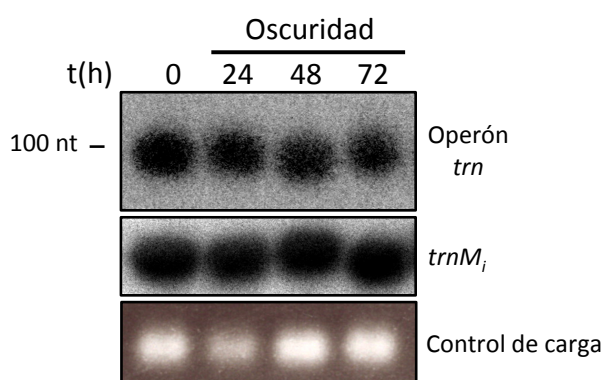


Figura 5.1.9.- Análisis de expresión del operón *trn* en respuesta a la oscuridad. Ensayo de northern blot con RNA extraído de células de *Anabaena* silvestre cultivadas durante 72 horas en oscuridad a 30°C en medio BG11. A los tiempos indicados arriba del panel se tomaron muestras de las que se extrajo RNA. Los niveles de transcrito se analizaron hibridando 2 μg de RNAs pequeños con una sonda del operón *trn*. A la izquierda se indica la posición del marcador de 100 nucleótidos. Debajo de la membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM_i* usado como normalizador, así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

5.1.2.2.- Análisis de la expresión del operón *trn* en respuesta a agentes que inducen estrés oxidativo

Con el objetivo de comprobar si el estrés oxidativo provoca la inducción de la expresión del operón *trn*, decidimos someter a *Anabaena* a la presencia de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o el herbicida metil viológeno (MV). Este último favorece la formación de ión superóxido al aceptar electrones del fotosistema I para reducir el oxígeno según la reacción de Mehler (Mehler, 1951). Así, se cultivaron células de *Anabaena* en presencia de peróxido de hidrógeno 150 ó 200 μM , o de metil viológeno 0.2 μM (Moirangthem

et al., 2014) y se analizó la expresión del operón *trn*. En la figura 5.1.10 se presentan los resultados de una de las réplicas del experimento. Los niveles de expresión de los tRNAs del operón muestran poca variación en el control y en el cultivo con 150 μM de peróxido de hidrógeno. En cambio, a las 24 h del inicio del tratamiento se observó una inducción drástica de 19.1 ± 3.39 veces ($n=2$) en los cultivos suplementados con 200 μM de H_2O_2 y de 24.75 ± 1.38 veces ($n=4$) en los suplementados con 0.2 μM de metil viológeno.

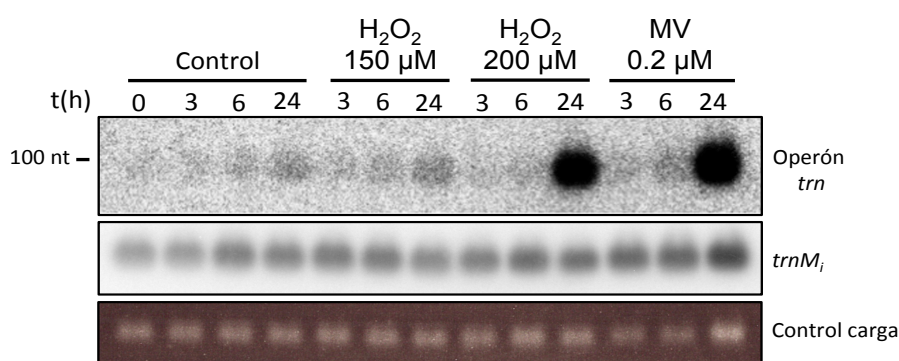


Figura 5.1.10.- Análisis de la expresión del operón *trn* en respuesta a agentes oxidantes. Ensayo de northern blot con 10 μg de RNA total procedente de células de *Anabaena* silvestre cultivadas durante 24 horas en condiciones estándar (control) o en presencia de los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a concentración final de 150 μM y 200 μM y metil viológeno (MV) 0.2 μM . Se tomaron muestras a los tiempos que se indica arriba (en horas), se extrajo RNA y se analizó la expresión de los tRNAs del operón hibridando con una sonda del operón *trn*. A la izquierda se indica la posición del marcador de 100 nucleótidos. Debajo de la membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM_i* usado como normalizador así como el gel de agarosa empleado como control de carga.

5.1.2.3.- Análisis de la expresión del operón *trn* en respuesta a estrés nutricional

En experimentos anteriores ya se había comprobado que la expresión del operón *trn* no varía según la fuente de nitrógeno (Figura 5.1.2, *Anabaena* silvestre). No obstante, ninguna de estas condiciones supone un estrés nutricional para *Anabaena*, que es capaz de crecer en medio sin nitrógeno combinado fijando N_2 atmosférico. Por ello se decidió inducir estrés de nitrógeno incubando las células en presencia de L-metionina sulfoximina (MSX), un análogo de aminoácidos que inhibe la actividad glutamina sintetasa, bloqueando la asimilación de cualquier fuente de nitrógeno (Pace & McDermott, 1952). Como se muestra en la figura 5.1.11, el operón *trn* mostraba una inducción muy acusada, de entre 70 y 110 veces, cuando las células se incubaban durante 24 h con concentraciones de MSX comprendidas entre 5 y 40 μM .

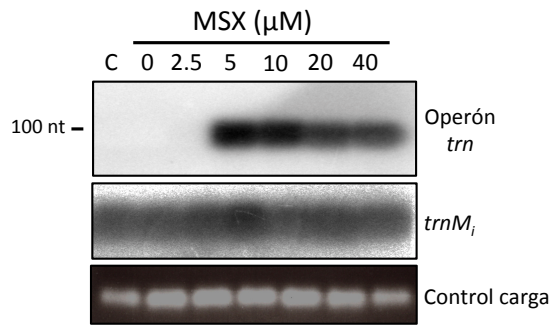


Figura 5.1.11.- Análisis de la expresión del operón *trn* en respuesta a la limitación de nitrógeno. Ensayo de northern blot con 2 μg de RNAs pequeños procedentes de células de *Anabaena* silvestre cultivadas durante 24 horas en condiciones estándar (control, C) o en presencia de MSX a las concentraciones indicadas arriba del panel. A las 24 horas se tomaron muestras de las que se extrajo RNA para analizar la expresión de los tRNAs del operón hibridando con una sonda del operón *trn*. A la izquierda se indica la posición del marcador de 100 nucleótidos. Debajo de la membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM_i* usado como normalizador, así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

Para las cianobacterias el CO_2 representa la principal fuente de carbono, que se fija por fotosíntesis. Con el objetivo de analizar si la expresión de los tRNAs del operón estaba regulada por el estrés nutricional provocado por la falta de carbono, se analizó su expresión en células de *Anabaena* sometidas a condiciones de limitación de carbono. Para ello, células que crecían en una mezcla de aire enriquecida con CO_2 al 1% (v/v), se cultivaron con burbujeo de aire o de aire carente de CO_2 , el cual se elimina al hacerlo pasar por una solución de KOH 1M. Se llevaron a cabo tres réplicas independientes de este experimento. En la figura 5.1.12 se muestran los resultados de un experimento representativo. La señal de hibridación observada indica que cuando se transfieren las células de *Anabaena* a la concentración de CO_2 atmosférica (aire), los niveles de transcrito durante las primeras 6 horas son similares a los del cultivo inicial (t_0). Sin embargo, tras 24 horas en estas condiciones se observa una señal de hibridación más intensa correspondiente a un aumento en el nivel de transcrito de los tRNAs del operón de 3.67 ± 0.8 veces ($n=3$). En condiciones de ausencia absoluta de CO_2 (0% CO_2), se observó un incremento paulatino en el nivel de expresión de los tRNAs del operón respecto al nivel basal, que se hizo máximo a las 24 horas con un nivel de inducción 4.6 ± 0.3 veces superior al basal ($n=3$).

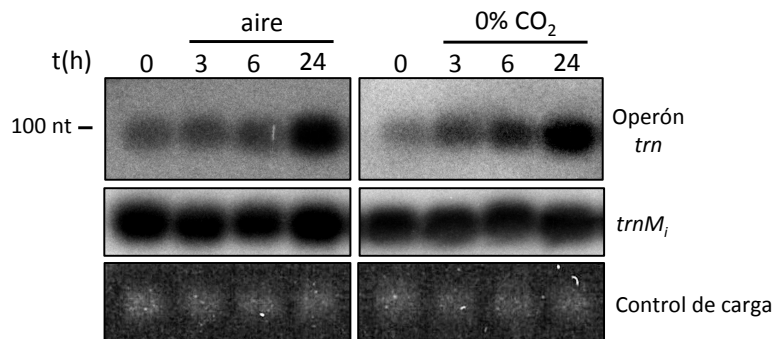


Figura 5.1.12.- Análisis de la expresión del operón *trn* en respuesta a la limitación de carbono. Ensayo de northern blot con 2 μg de RNAs pequeños procedentes de células de *Anabaena* cultivadas durante 24 horas con burbujeo de aire o aire carente de CO_2 (0% CO_2). Se tomaron muestras a los tiempos que se indica arriba (en horas) y se extrajo RNA que se hibridó con una sonda del operón *trn*. A la izquierda se indica la posición del marcador de 100 nucleótidos. Debajo de cada membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM_i* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

El zinc es un elemento esencial para el crecimiento de todos los seres vivos. En nuestro laboratorio se ha caracterizado la respuesta adaptativa a la deficiencia de zinc en *Anabaena*, que se puede mimetizar en el laboratorio mediante la adición del quelante TPEN a los cultivos (Napolitano *et al.*, 2012). Se analizó la expresión del tRNA^{Ala}-UGC(2), codificado en el operón *trn*, en respuesta a la adición de TPEN a cultivos de *Anabaena*. Se pudo comprobar que, de forma similar a lo observado para genes que responden a la deficiencia de zinc, el tRNA del operón se inducía 19.5 ± 3.2 veces ($n=3$) respecto al nivel basal de expresión (t_0) tras 24 horas de tratamiento con TPEN (Figura 5.1.13). Varios experimentos similares se hicieron con otros tRNAs del operón e incluso con sondas que abarcaban todo del operón *trn* y, aunque en todos los experimentos se producía la inducción de los genes del operón, se observó cierta variabilidad tanto en la magnitud de la inducción como en el momento en que se produce.

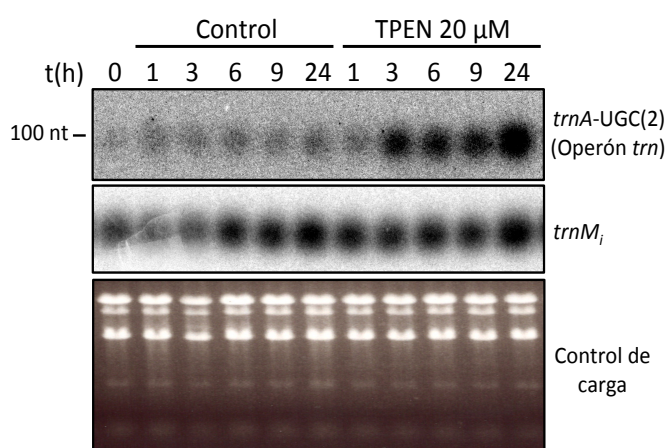


Figura 5.1.13.- Análisis de la expresión del operón *trn* en respuesta a la deficiencia de zinc. Ensayo de northern blot con 10 μg de RNA procedente de células de *Anabaena* cultivadas durante 24 horas en presencia de TPEN 20 μM. A los tiempos indicados arriba (en horas), se tomaron muestras de las que se extrajo RNA para analizar la expresión del tRNA^{Ala} del operón *trn* mediante la hibridación con una sonda específica. A la izquierda se indica la posición del marcador de 100 nt. Debajo de la membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM_i* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

5.1.3.- Análisis de la regulación del operón *trn*

Se ha mostrado que el operón *trn* se induce por tratamiento con agentes oxidantes o en diversas condiciones de estrés nutricional, exhibiendo un patrón de expresión complejo no observado hasta la fecha en cianobacterias. Estos resultados sugieren una posible regulación a nivel transcripcional que llevó a plantear la identificación de los promotores del operón y la búsqueda de posibles reguladores.

5.1.3.1.- Identificación y caracterización de promotores

Para analizar el/los promotores del operón es necesario identificar los sitios de inicio de la transcripción (tsps). Para ello se empleó la técnica de 5'-RACE (apartado 2.3.2.6) que permite distinguir moléculas de RNA primario con un grupo trifosfato en su extremo 5', que corresponden a inicios de la transcripción, de moléculas de RNA con un grupo monofosfato en

el extremo 5', que corresponden a productos del procesamiento de transcritos más largos (Bensing *et al.*, 1996).

Para este experimento se utilizaron muestras de RNA procedentes de células de *Anabaena* cultivadas durante 24 horas en presencia o ausencia de metil viológeno 0.2 μ M. Para la retrotranscripción se utilizó alternativamente el cebador clusterRT-5 o el cebador clusterRT- 1 (figura 5.1.14A), que alinean respectivamente con una secuencia intermedia del gen *trnS-CGA(2)* del operón *trn* o con una secuencia inmediatamente aguas arriba del primer gen del operón. En los experimentos con el cebador clusterRT-5 se observó una banda muy intensa de unos 300 pb (Figura 5.1.14B, flecha roja) ausente en las muestras control no tratadas con polifosfatasa. En los experimentos con el cebador clusterRT-1 se observó una banda diferencial de unos 800 pb (Figura 5.1.14B, flecha verde) ausente en las muestras no tratadas con polifosfatasa. El DNA de estas bandas se clonó en el vector comercial pSpark I (Canvax) y se secuenció permitiendo identificar un tsp 80 pb aguas arriba del primer tRNA del operón (tsp1 en la figura 5.1.14A) y un segundo tsp (tsp2 en la figura 5.1.14A) 329 pb aguas arriba del gen *all8564* que precede al operón *trn*.

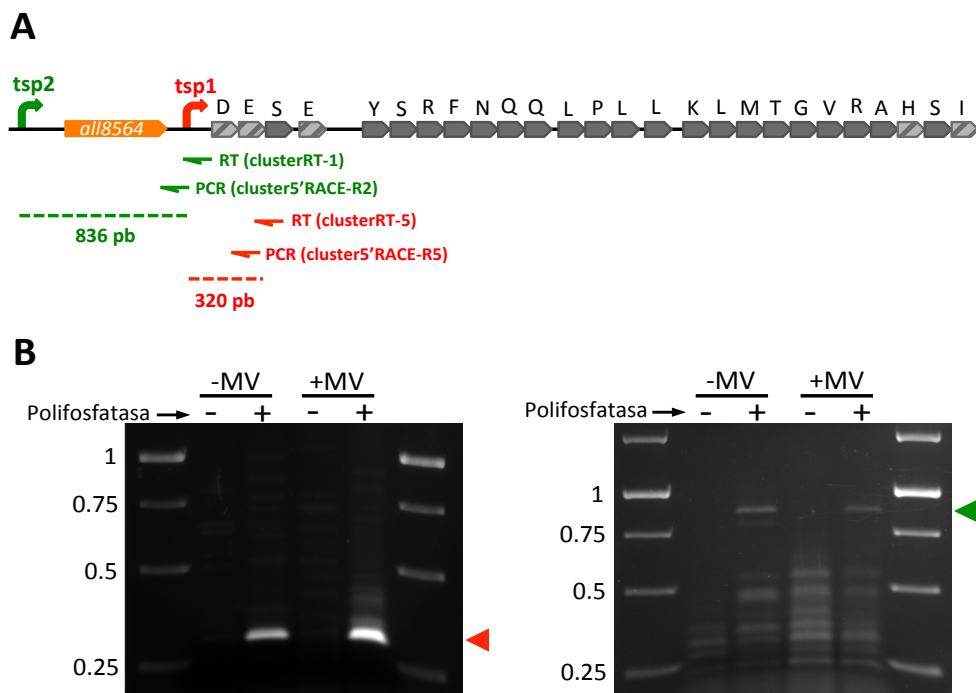


Figura 5.1.14.- Identificación de promotores por 5'-RACE. (A) Representación esquemática de los genes del operón *trn* (la letra en mayúscula indica el aminoácido que descodifica cada tRNA) y de la ORF *all8564*. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de retrotranscripción (RT) y PCR que permitieron localizar el *tsp1* se simbolizan como flechas rojas. Los oligonucleótidos empleados para localizar el *tsp2* se representan con flechas verdes. A la derecha de cada oligonucleótido se especifica para qué tipo de reacción se emplearon y, entre paréntesis, el nombre del oligonucleótido empleado. Las flechas en ángulo recto indican los sitios de inicio de la transcripción identificados. **(B)** Electroforesis de los productos de las reacciones de 5'-RACE. Muestras de RNA de células de *Anabaena* silvestre cultivadas en presencia (+MV) o ausencia (-MV) de metil viológeno fueron tratadas (+) o no (-) con polifosfatasa y sometidas a las reacciones de la técnica 5'-RACE. Los números de la izquierda indican las posiciones de los marcadores de DNA en Kb. Las bandas diferenciales que se purificaron y secuenciaron para identificar el *tsp1* y *tsp2* se representan con una flecha roja y verde respectivamente.

Es necesario destacar que para el *tsp1* se observa una mayor intensidad en la banda obtenida con la muestra tratada con metil viológeno (figura 5.1.14B, panel de la izquierda). Ello es consistente con el patrón observado en los experimentos de northern blot y sugiere que este promotor está regulado.

La secuencia aguas arriba del *tsp1* mostraba regiones muy similares a la secuencias de las cajas -35 y -10 del promotor consenso dependiente de σ^{70} en procariontas (TTGACA y TATAAT, respectivamente) con un espaciamiento óptimo de 17 nt (Figura 5.1.15). Para el *tsp2* se detectaron posibles cajas -35 y -10 distanciadas en 18 nt.

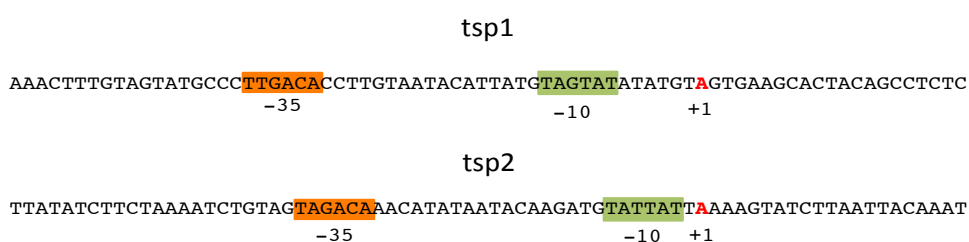
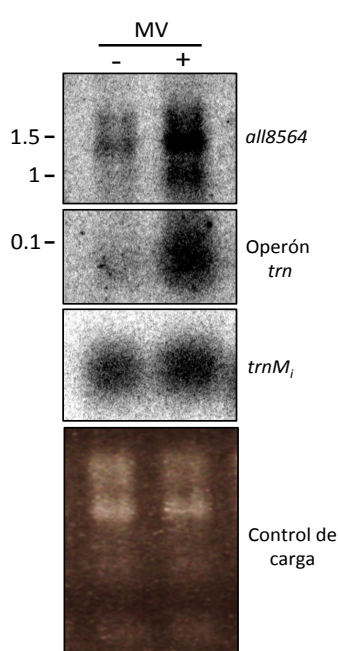


Figura 5.1.15.- Secuencia de los promotores identificados en el operón *trn*. Se representan con un rectángulo naranja la posible caja -35 y mediante un rectángulo verde la posible caja -10. Para ambos promotores el inicio de la transcripción mapeado por 5'-RACE se indica con una letra roja.

5.1.3.2.- Co-regulación del gen *all8564* con el operón de tRNAs

Los experimentos de 5'-RACE indican la existencia de transcritos solapantes entre el gen *all8564* y el operón *trn*, lo que es consistente con datos previos de otros investigadores (Tesis Doctoral de Leonor Puerto Galán, 2011). Para comprobar si el gen *all8564* se regula de la misma forma que el operón *trn* se analizó su expresión mediante northern blot. En la figura 5.1.16 se muestra que el gen *all8564* (primer panel) muestra un patrón de expresión similar al del operón *trn* en células tratadas con (segundo panel). Se observan bandas discretas de 1 y

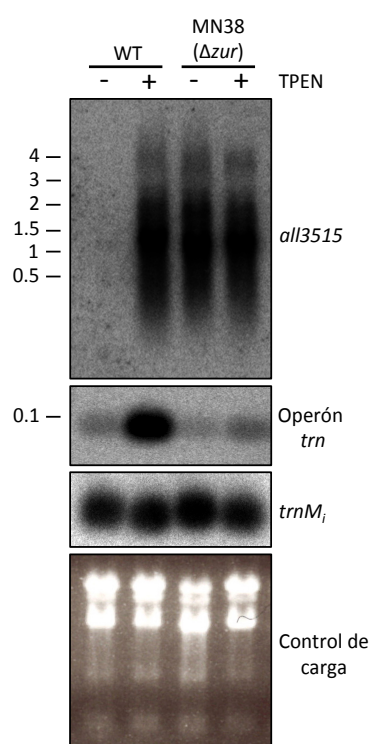


1.5 Kb que aumentan su intensidad en presencia de MV. El tamaño de estas bandas es superior al esperado para un mRNA monocistrónico del gen *all8564*, cuya ORF tiene un tamaño de 537 pb, e incluso a la suma del tamaño de esta ORF y el espacio intergénico que lo separa del operón *trn* (202 pb), lo que sugiere que la señal de hibridación detectada corresponde a transcritos policistrónicos.

Figura 5.1.16.- Perfil de expresión del gen *all8564* y el operón *trn*. 10 µg de RNA total procedente de células de *Anabaena* silvestre cultivadas durante 24 horas en ausencia (-) y presencia (+) de metil viológeno (MV) 0.2 µM se hibridaron con las sondas que se indican a la derecha de cada panel. A la izquierda se indica la posición de los marcadores de peso molecular de RNA (en Kb). Debajo de la membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM_i* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

5.1.3.3.- Identificación de reguladores

Los experimentos anteriores muestran que el operón *trn* se induce por estímulos muy diversos. Dado que se conocen algunos reguladores que median la respuesta a alguno de los estímulos aquí utilizados, se probó si aquellos podrían estar involucrados en la regulación del operón. En nuestro grupo se ha caracterizado el regulador Zur que controla la expresión de genes que responden a la deficiencia de zinc tras la adición del quelante TPEN a los cultivos. Se analizó la expresión del operón *trn* en la estirpe silvestre y un mutante carente del regulador Zur (MN38) (Napolitano *et al.*, 2012) en cultivos en ausencia o presencia de TPEN 20 μ M. El patrón de expresión del operón *trn* se comparó con el del gen *all3515*, diana del regulador Zur. Es importante señalar que, salvo alguna excepción, Zur actúa como represor en todas las bacterias. Consistentemente, *all3515* se muestra inducido en el mutante MN38 incluso en condiciones de no inducción (Figura 5.1.17, panel superior). Ello no se observa para el operón *trn* (Figura 5.1.17, segundo panel), lo que implica que su promotor no se regula por represión



de Zur, lo que es consistente con la ausencia de cajas Zur en los promotores identificados. No obstante, es necesario destacar que el nivel de expresión tras tratamiento con TPEN observado en MN38 es sensiblemente menor al del silvestre. Ello podría ser una consecuencia del funcionamiento subóptimo de las células del mutante o podría sugerir que Zur ejerce una influencia positiva, probablemente de un modo indirecto.

Figura 5.1.17.- Análisis de la implicación de Zur en la regulación de la expresión del operón *trn*. Northern blot con 10 μ g de RNA total de células de *Anabaena* silvestre (WT) y del mutante MN38 cultivadas durante 24 horas en presencia (+) o ausencia (-) de 20 μ M TPEN. Las sondas utilizadas para analizar los niveles de transcrito se indican a la derecha de cada panel. Las posiciones de los marcadores (en Kb) se indican a la izquierda del panel. Debajo de la membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM₁* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

Otro de los estímulos que provocan una inducción en la expresión de los genes del operón *trn* es la limitación de carbono (Figura 5.1.12). En *Anabaena* se ha identificado la proteína PacR, producto del gen *all3953*, como el regulador global de los genes implicados en la asimilación de carbono (Picossi *et al.*, 2015). Se analizó la expresión del operón *trn* en la estirpe silvestre de *Anabaena* y en el mutante CSS74 (proporcionado por las Dras. Silvia Picossi

y Antonia Herrero) en el que el gen *all3953* se encuentra inactivado por la inserción de una *cassette* de resistencia a antibióticos. Para este estudio se cultivaron células de *Anabaena* silvestre y del mutante CSS74 durante 24 horas en presencia de metil viológeno o en condiciones de limitación de carbono. Se analizó mediante northern blot la expresión del operón *trn* y, en paralelo, la del gen *pacR* y el gen *flv4*, este último como control de un gen regulado positivamente por PacR (Picossi *et al.*, 2015). En la figura 5.1.18 se muestran los resultados de este experimento.

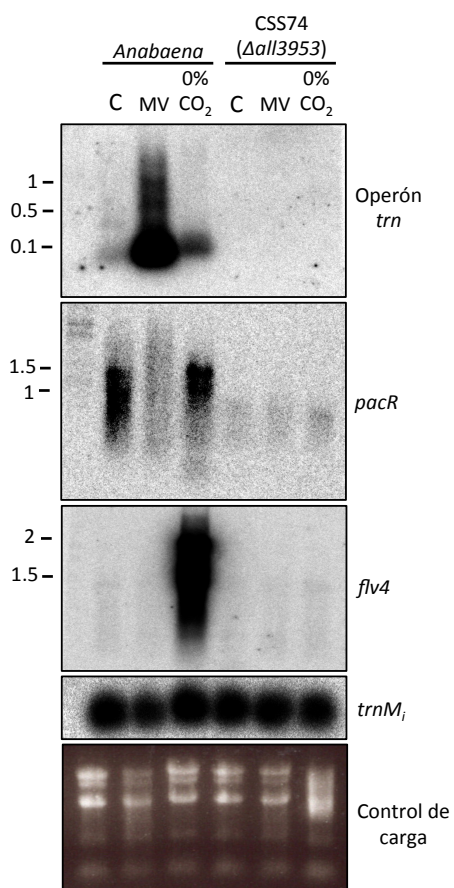


Figura 5.1.18.- Expresión del operón *trn* en *Anabaena* y el mutante CSS74. Ensayo de northern blot con 10 µg de RNA total extraído de células de *Anabaena* silvestre y del mutante CSS74 cultivadas durante 24 horas en condiciones estándar (control, C) y tras un tratamiento de 24 horas con metil viológeno (MV) 0.2 µM o tras 24 horas de limitación de carbono (0% CO₂). Los RNAs se hibridaron con las sondas que se indican a la derecha de cada panel. Los números de la izquierda de cada panel indican las posiciones de los marcadores de tamaño de RNA en Kb. Debajo de las membranas se muestra la hibridación con el gen *trnM₁* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

La señal observada con la sonda de *pacR* (*all3953*) en la estirpe silvestre es un barrido que ocupa la zona entre 1.6 Kb y 1 Kb (Figura 5.1.18, segundo panel). El tamaño esperado para el transcrito de *pacR* es de 1 Kb, no obstante el inicio de la transcripción se encuentra 600 pb aguas arriba, lo que explica la existencia de un transcrito de 1.6 Kb. Por otra parte, el nivel de transcrito de *pacR* en la estirpe silvestre no varía en condiciones de limitación de carbono respecto al nivel de expresión basal (C), pero disminuye considerablemente en presencia de metil viológeno. Como se esperaba, en la estirpe CSS74 los niveles de expresión de *pacR* son indetectables en todas las condiciones probadas (figura 5.1.18, segundo panel). También de acuerdo a lo esperado, el gen *flv4* en la estirpe silvestre se induce en limitación de carbono

(figura 5.1.18, tercer panel), lo que confirma lo observado por Picossi *et al.* en ensayos de PCR cuantitativa (Picossi *et al.*, 2015), pero no tras tratar con metil viológeno. En el mutante CSS74 los niveles de expresión del gen *flv4* son similares al nivel basal en todas las condiciones.

Como se ha mostrado anteriormente, el nivel de expresión del operón *trn* en la estirpe silvestre aumenta, aunque en distinta medida, en presencia de metil viológeno y de limitación de carbono (Figura 5.1.18, panel superior). En el mutante CSS74 no se observa expresión del operón, siendo en todas las condiciones inferior incluso a la expresión basal, lo que indica que PacR es un elemento necesario para la expresión del operón *trn*.

Dado el papel central de PacR en la adaptación de *Anabaena* a condiciones de limitación de carbono, estos resultados planteaban la posibilidad de que el operón *trn* formara parte de esta respuesta adaptativa. Para indagar en este aspecto, se cultivaron células de *Anabaena* silvestre y del mutante de delección CLUSTER-CK1, en el que el operón *trn* está ausente (Puerto-Galan & Vioque, 2012), en condiciones de deficiencia de carbono (0% CO₂). En tres experimentos independientes se observó que la estirpe silvestre no crecía en estas condiciones pero las células mantenían su pigmentación y permanecían viables, en cambio, las células del mutante se decoloraban tras aproximadamente 72 h del inicio del experimento y perdían viabilidad rápidamente (Figura 5.1.19). Estos resultados sugieren que los tRNAs codificados en el operón *trn* podrían jugar un papel importante para la supervivencia de las células de *Anabaena* en limitación de carbono.

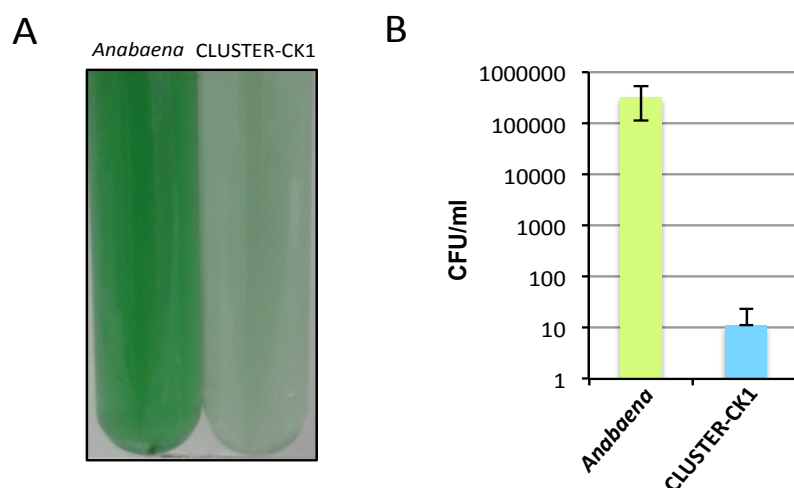


Figura 5.1.19.- Crecimiento de *Anabaena* y del mutante CLUSTER-CK1 en ausencia de carbono. (A) Fotografías de cultivos de *Anabaena* silvestre y del mutante CLUSTER-CK1 creciendo en medio BG11 a 30°C con burbujeo de aire carente de CO₂. Fotografías tomadas a las 48 horas en estas condiciones de cultivo. **(B)** Ensayo de supervivencia en condiciones de cultivo con 0% de CO₂. Células de la estirpe silvestre de *Anabaena* o de la estirpe mutante CLUSTER-CK1 se cultivaron en iluminación a 30°C burbujéandolos con aire carente de CO₂ (que se secuestra al hacerlo pasar por una solución de KOH 1M). Tras 3 días de cultivo, se sembraron diluciones en placas para determinar las unidades formadoras de colonias (CFU). La gráfica muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

5.1.3.4.- Análisis de la expresión del operón *trn* en presencia de inhibidores de la traducción

Puesto que los tRNAs son un componente esencial de la maquinaria de traducción, se decidió analizar la expresión del operón *trn* en presencia de antibióticos que afectan a la síntesis de proteínas como el cloranfenicol y la espectinomicina. Para ello, se cultivó *Anabaena* en presencia de concentraciones sub-letales (que retardan el crecimiento pero no lo inhiben ni provocan muerte celular) de estos antibióticos. En la figura 5.1.20, se observa que tras 9 horas de crecimiento en presencia de 10 µg/ml de cloranfenicol la señal correspondiente a los tRNAs del operón aumenta ligeramente en intensidad. Sin embargo, a las 24 horas de tratamiento se observó un drástico aumento en el nivel de inducción de 270 ± 18.1 veces ($n=2$) (Figura 5.1.20, panel izquierdo). Esta inducción se observaba también con 40 µg/ml de cloranfenicol aunque en menor medida. Por otro lado se ensayaron distintas concentraciones de espectinomicina, observándose unos niveles de inducción similares a los obtenidos con cloranfenicol 10 µg/ml cuando las células se incubaron durante 24 h en presencia de 0.5 µg/ml de espectinomicina (Figura 5.1.20, panel derecho).

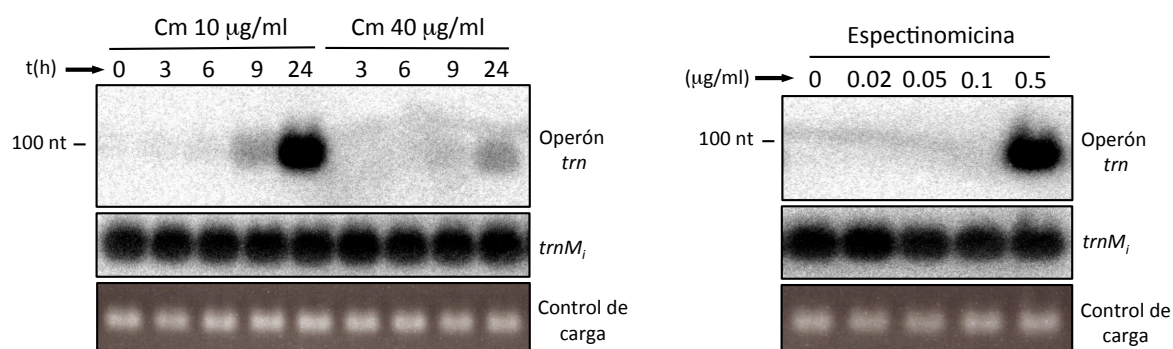


Figura 5.1.20.- Expresión del operón *trn* en respuesta a la presencia de cloranfenicol y espectinomicina. Ensayo de northern blot con 2 µg de RNAs pequeños procedentes de cultivos de *Anabaena* tratados con cloranfenicol (Cm) o espectinomicina. Para el tratamiento con Cm (panel izquierdo), se tomaron muestras a los tiempos que se indica arriba, mientras que para el tratamiento con espectinomicina (panel derecho) se emplearon las concentraciones indicadas sobre el panel y se tomaron muestras a las 24 horas. De las diferentes alícuotas se extrajo RNA que se hibridó con una sonda del operón *trn*. A la izquierda de cada panel se indica la posición del marcador de 100 nucleótidos. Debajo de cada membrana se muestra la hibridación con el gen *trnM₁* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

Estos resultados llevaron a plantear si otros antibióticos que afectan selectivamente al ribosoma como la neomicina, estreptomina, eritromicina o la tetraciclina (Wilson, 2014) serían también inductores de la expresión del operón *trn*. Se determinó la concentración inhibitoria para aquellos antibióticos que no son de uso común en *Anabaena* y, a continuación, se ensayó mediante northern blot la expresión del operón *trn* en presencia de concentraciones sub-inhedoras del crecimiento. Como control, se ensayó un cultivo sin tratar así como

cultivos suplementados con penicilina G, un antibiótico que afecta a la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.1.21.

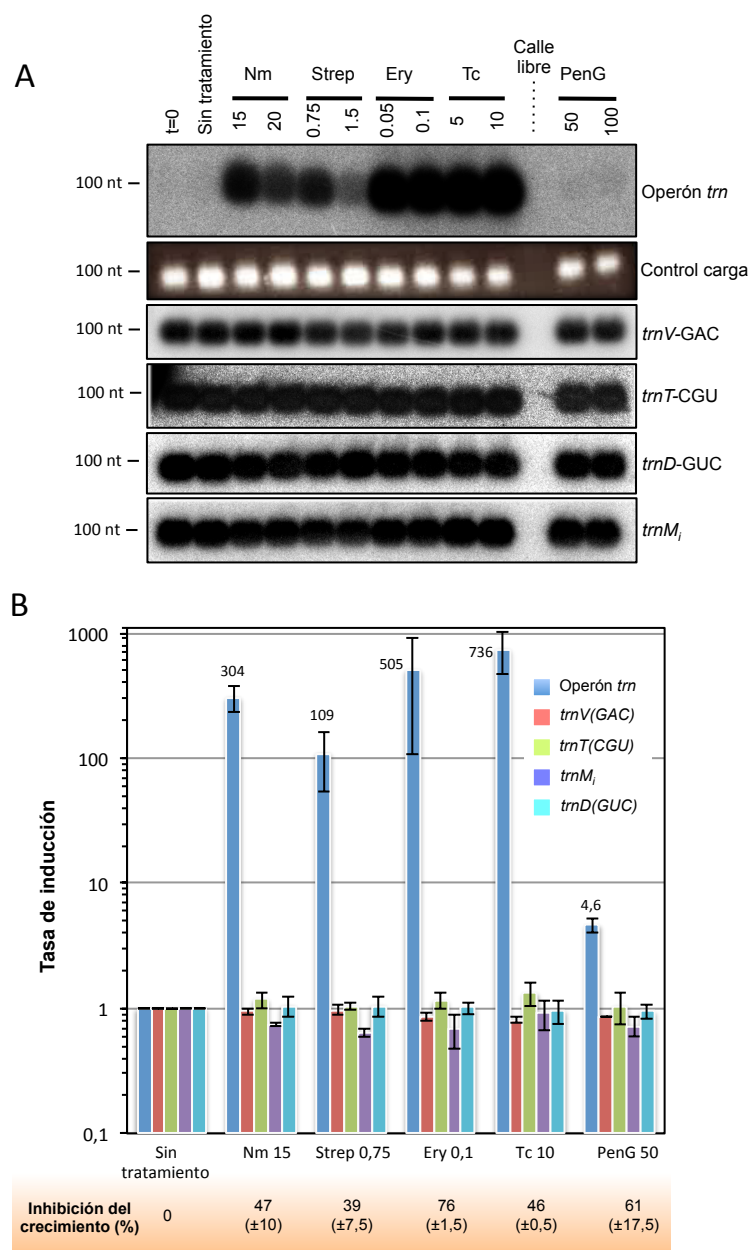


Figura 5.1.21.- Análisis de la expresión del operón *trn* y de genes de tRNAs del cromosoma en respuesta a la presencia de antibióticos. (A) Los paneles muestran ensayos de northern blot realizados con la sonda que se indica a la derecha de cada panel. Cada calle contiene 2 µg de RNA pequeño de cultivos de *Anabaena*. La calle control contiene RNA de un cultivo inicial (t_0) a una concentración de 3 µg de clorofila/ml que se dividió en 11 cultivos, uno de los cuales se cultivó 24 h sin tratamiento adicional mientras que a los otros se les suministró antibióticos (Nm, neomicina; Strep, estreptomicina; Ery, eritromicina; Tc, tetraciclina; PenG, penicilina G) a las concentraciones finales que se indican arriba (en µg/ml) durante 24 h. Bajo el primer panel de northern se muestra, como control de carga, la foto del gel antes de ser transferido. A la izquierda de cada panel se indica la posición del marcador de 100 nucleótidos. **(B)** Representación del nivel relativo de expresión del operón *trn* y los genes de tRNA cromosómicos que se indican. El histograma muestra la tasa de inducción, que se define como la intensidad de la señal de northern respecto a la del cultivo sin tratamiento, que se ha normalizado asignándole un valor arbitrario de 1. Nótese que la escala es logarítmica. Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los números sobre el histograma indican la tasa de inducción del operón *trn*. Bajo cada tratamiento se indica el porcentaje de inhibición del crecimiento calculado como la razón (Δx (cultivo con antibióticos) / Δx (cultivo sin tratamiento)) \times 100, siendo Δx la diferencia entre la absorbancia final y la inicial a 750 nm. Los valores indican la media \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes.

Los resultados muestran que todos los antibióticos que afectan específicamente al ribosoma indujeron un incremento notable (órdenes de magnitud respecto al nivel basal) en el nivel de expresión del operón *trn* (Figura 5.1.21A). Interesantemente la penicilina G, que no afecta al ribosoma, sólo provoca una ligera inducción de 3-4 veces, aunque su efecto sobre el crecimiento del cultivo es de una magnitud similar a la de los otros antibióticos (Figura 5.1.21B). La notable inducción del operón *trn* por antibióticos que afectan a la traducción llevó a considerar si este efecto era específico de dicho operón o si otros genes *trn* del cromosoma también se inducían con estos estímulos. Para comprobarlo se ensayó la expresión de los genes *trnV*-GAC, *trnT*-CGU, *trnM_i* (que codifica el tRNA^{Met} iniciador) y *trnD*-GUC. Como se observa en los paneles inferiores de la figura 5.1.21A, el nivel de los tRNAs codificados por estos genes cromosómicos no experimentó variación alguna con ninguno de los tratamientos ensayados.

Una observación interesante de los experimentos anteriores es que el operón *trn* se induce por muy diversos estímulos, si bien algunos, como los antibióticos que afectan al ribosoma provocan una inducción de órdenes de magnitud respecto al nivel basal mientras que en otros casos la inducción observada es mucho más modesta. Para poder comparar la respuesta del operón *trn* a los distintos estímulos, se llevó a cabo un experimento con *Anabaena* silvestre en el que un mismo cultivo se fraccionaba y se sometía a distintos tratamientos. Como se muestra en la figura 5.1.22, el nivel de inducción máximo se observó tras tratar las células con cloranfenicol durante 24h, mientras que el resto de estímulos provocaba una inducción considerablemente menor.

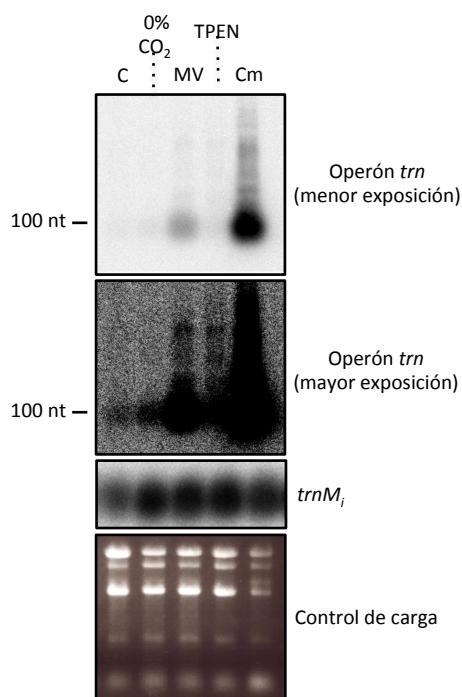


Figura 5.1.22.- Análisis comparativo de la expresión del operón *trn* en respuesta a distintos estímulos. El primer panel muestra un ensayo de northern blot con 10 µg de RNA total procedentes de células de *Anabaena* cultivadas durante 24 horas en BG11 (control, C), en BG11 y gaseo con aire carente de CO₂ (0% CO₂) o en BG11 suplementado con 0.2 µM de metil viológeno (MV), TPEN 20 µM o cloranfenicol (Cm) 10 µg/ml. A las 24 horas de tratamiento se recogieron los cultivos y se extrajo RNA que se hibridó con una sonda del operón *trn*. Con objeto de mostrar la inducción en la expresión del operón *trn* debida a la limitación de carbono, MV y TPEN, el segundo panel muestra la misma membrana que la del primer panel con una imagen que se ha tomado con un mayor tiempo de exposición. A la izquierda de cada panel se indica la posición del marcador de 100 nucleótidos. Debajo se muestra la hibridación con el gen *trnM_i* usado como normalizador así como el gel de agarosa utilizado como control de carga.

5.1.4.- Análisis del mecanismo de acción de los tRNAs codificados en el operón *trn*

En general los tRNAs cumplen su función principal durante la traducción aportando los aa-tRNAs necesarios para la síntesis de proteínas. Sin embargo, también pueden ejercer funciones adicionales (Raina & Ibba, 2014). Estudios previos realizados por Puerto-Galán y Vioque habían demostrado que al menos 15 de los tRNAs del operón *trn* se aminoacilaban *in vivo* (Puerto-Galan & Vioque, 2012). Se decidió estudiar si el destino de estos aminoacil-tRNAs es el ribosoma, lo cual sería una indicación de que bien participan en la síntesis de proteínas o juegan algún otro papel (un papel regulatorio, por ejemplo) en este orgánulo.

Para ello, se analizó la presencia de los tRNAs del operón en la fracción polisómica de *Anabaena*, que contiene aquellos ribosomas unidos al RNA mensajero que se encuentran traduciendo de forma activa (Noll, 2008). Los detalles del procedimiento pueden consultarse en el apartado 2.3.4.5. Para el experimento, se utilizaron células de *Anabaena* en las que se había inducido la expresión del operón *trn* mediante incubación durante 24 horas en presencia de metil viológeno 0.2 μ M. Los extractos se fraccionaron en gradientes de sacarosa del 7% al 50%, que permiten separar las distintas fracciones ribosómicas en función de su densidad. La presencia de subunidades ribosómicas, ribosomas y polisomas se detecta en ellas monitorizando su absorbancia a 254 nm. El procedimiento se probó en primer lugar con extractos de la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* siguiendo los protocolos descritos para esta bacteria modelo (Qin & Fredrick, 2012) (Figura 5.1.23).

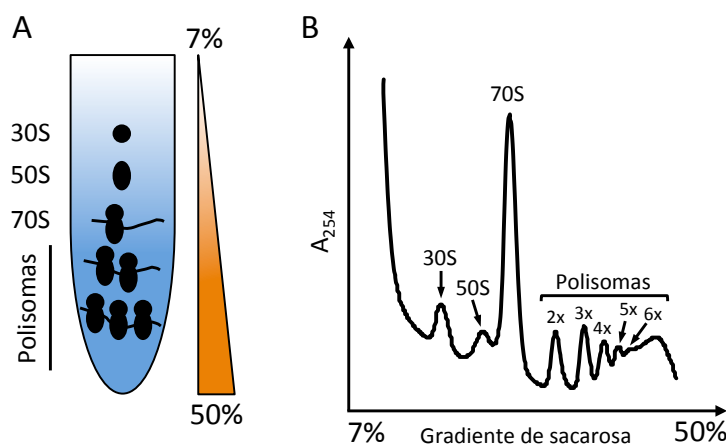


Figura 5.1.23.- Aislamiento de polisomas de *E. coli*. (A) Representación del gradiente de sacarosa del 7%-50% utilizado para resolver las distintas fracciones ribosómicas. Se indica la posición en la que se encuentra cada fracción a lo largo del gradiente. (B) Perfil obtenido al monitorizar la absorbancia a 254 nm (A_{254}) de las fracciones ribosómicas separadas previamente en gradiente de sacarosa.

En la figura 5.1.23B se muestra el perfil de obtenido. En él que se distinguen polisomas con hasta 6 ribosomas unidos al RNA mensajero. Este mismo protocolo se aplicó a *Anabaena* introduciendo algunas modificaciones para optimizarlo. No obstante, tras repetidos intentos

no se consiguieron perfiles de la misma calidad que los obtenidos con *E. coli*, pudiendo distinguir polisomas con un máximo de 3 ribosomas (Figura 5.1.24). Este bajo rendimiento podría deberse a una mayor inestabilidad de los polisomas en *Anabaena*.

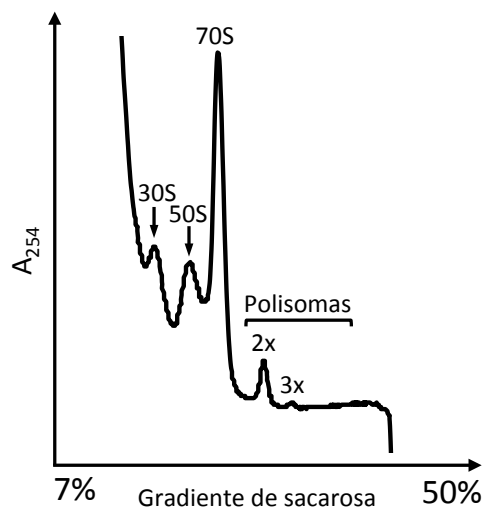


Figura 5.1.24.- Aislamiento de polisomas de *Anabaena*. Perfil de polisomas de *Anabaena* obtenido al monitorizar la absorbancia a 254 nm (A_{254}) de las fracciones ribosómicas separadas previamente en gradiente de sacarosa.

Para comprobar si a pesar de ello las fracciones de mayor densidad contenían polisomas se repitió el experimento incluyendo un tratamiento muy breve con RNasa justo antes de la carga de la muestra en el gradiente. Los RNAs ribosómicos son relativamente resistentes a la degradación por la RNasa al estar protegidos por las proteínas ribosomales. En cambio, el RNA mensajero que forma parte de los polisomas está parcialmente desprotegido de manera que el tratamiento con RNasa lo degrada en las zonas inter-ribosómicas. El tratamiento con RNasa por tanto, destruye los polisomas desplazando los ribosomas que los constituían a la fracción monosómica 70S. Se realizaron gradientes en paralelo con o sin tratamiento con 1U de RNasa A. Tras el fraccionamiento se cargó 20 μ l de cada fracción en un gel de agarosa que se resolvió por electroforesis. El resultado obtenido se muestra en la figura 5.1.25. Como puede observarse, los RNAs ribosómicos 23S y 16S desaparecen de las últimas fracciones (correspondientes a los polisomas) en la muestra tratada con RNasa, de lo que se deduce que efectivamente en los gradientes con extractos de *Anabaena* las fracciones de alta densidad contienen polisomas.

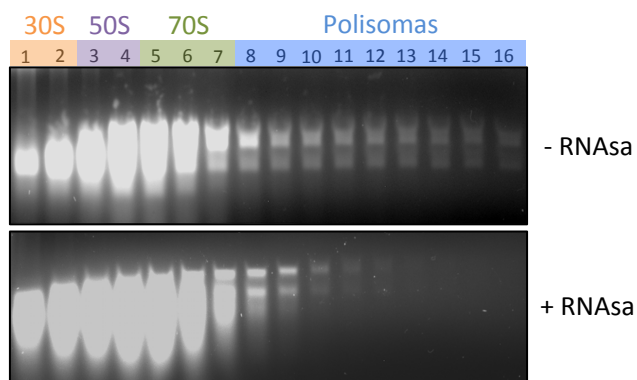


Figura 5.1.25.- Tratamiento con RNasa de extractos de *Anabaena*. Extractos de *Anabaena* se dividieron en dos. Uno de ellos se trató con 1U de RNasa antes de ser resuelto en un gradiente de sacarosa. Los gradientes se fraccionaron y se cargaron 20 μ l de cada fracción en geles de agarosa. El panel de arriba corresponde al perfil polisómico de la muestra sin tratar con RNasa. El panel de abajo corresponde al perfil de la muestra tratada con RNasa.

Una vez aislados con éxito los polisomas de *Anabaena*, se analizó la presencia de los tRNAs del operón *trn* en la fracción polisómica. Para ello se aisló RNA de la fracción polisómica como se describe en el 2.3.4.5.1 y se comprobó la presencia de los tRNAs mediante RT-PCR. 1 µg del RNA de fracción polisómica y, como control, 1 µg de RNA total se sometieron a retrotranscripción y el cDNA se amplificó posteriormente por PCR con oligonucleótidos específicos para cada tRNA (los cebadores usados para la reacción de retrotranscripción y PCR pueden consultarse en el apartado 2.3.4.5.2b). En paralelo se realizaban reacciones control a las que no se les añadía transcriptasa reversa para poder detectar la presencia de DNA contaminante. Se analizaron 11 tRNAs del operón. Como se esperaba, todos los tRNAs analizados se encuentran presentes en el RNA total de *Anabaena*, pues se observa una banda de amplificación del tamaño esperado (Figura 5.1.26). En la fracción polisómica se detectaron 10 de los 11 tRNAs estudiados, únicamente no se detectó el tRNA^{Ser}-CGA(2). Es muy importante destacar que en este experimento se utilizaron como controles negativos dos RNAs de un tamaño similar al de un tRNA. Unos de ellos, *int2*, es un RNA de 70 nucleótidos que se genera por el procesamiento del transcrito del operón *trn* y que corresponde al espacio intergénico entre el tRNA^{Glu}-UUC(2) y el tRNA^{Tyr}-GUA(2). Este RNA es un control adecuado porque se expresa al mismo nivel que los tRNAs del operón y además es estable (Puerto-Galan & Vioque, 2012). No obstante, al no ser un tRNA, no se espera su presencia en la fracción polisómica. En segundo lugar se utilizó como control negativo un RNA pequeño regulador (*Syr22*) de 66 nucleótidos, cuya presencia en los polisomas tampoco es esperable. Como se observa en la figura 5.1.26, se detectó la presencia de ambos controles en las muestras de RNA total pero no en la fracción polisómica. Estos resultados revelan que al menos 10 de los tRNAs codificados en el operón *trn* de *Anabaena* se encuentran en ribosomas activos lo que podría indicar que participan en la síntesis de proteínas o ejercen algún otro papel en estos orgánulos.

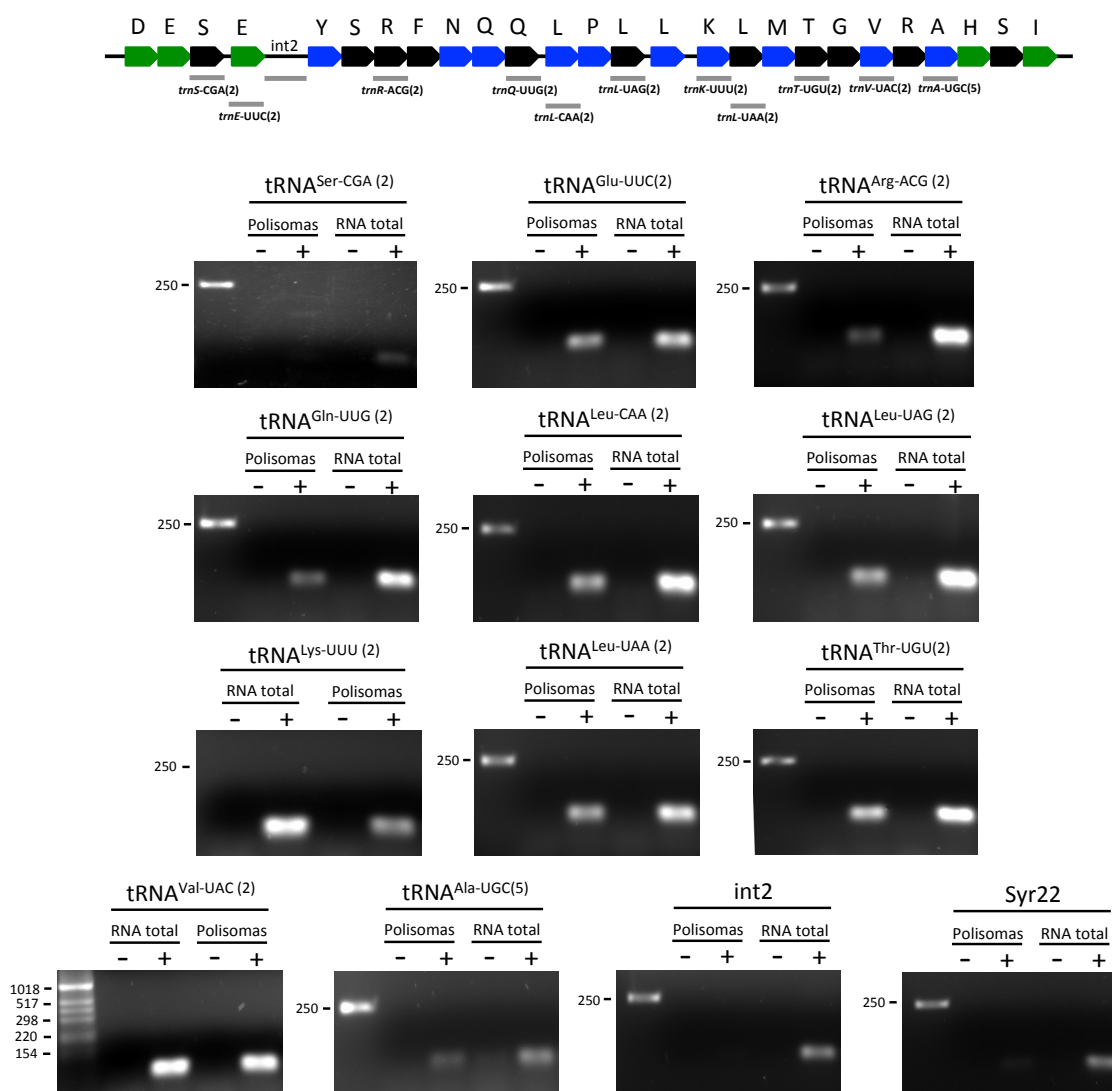


Figura 5.1.26.- Análisis de la presencia de los tRNAs del operón *trn* en polisomas. RT-PCR a 25 ciclos a partir de RNA procedente de RNA total y de la fracción polisómica de *Anabaena*. Cada panel corresponde al resultado de la amplificación por PCR del cDNA obtenido mediante retrotranscripción de cada uno de los genes que codifican para los tRNAs del operón indicados arriba (líneas grises). + y - indican respectivamente la adición o no de transcriptasa reversa (RT) a la reacción de retrotranscripción. Los números de la izquierda de cada panel indican las posiciones del marcador de peso molecular (en pb).

5.2 DISCUSIÓN

5.2.1.- Presencia de agrupamientos de genes *trn* en las cianobacterias

Los agrupamientos de genes de tRNA son frecuentes en bacterias Gram-positivas del grupo de los firmicutes. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* cuenta con 21 operones *trn* con un máximo de 21 genes por operón. Los agrupamientos largos de genes *trn* son en cambio poco frecuentes en bacterias Gram-negativas (Tran *et al.*, 2015). Hasta ahora se sabía de la existencia de agrupamientos *trn* en cuatro cianobacterias, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Oscillatoria* sp. PCC 6506, y *Acaryochloris marina* MBIC11017. A pesar de su distancia filogenética se dedujo, por la conservación parcial del orden de los genes, que el agrupamiento *trn* de las cuatro cianobacterias tenía un origen evolutivo común (Puerto-Galan & Vioque, 2012). En este trabajo se ha analizado la presencia de agrupamientos *trn* en los aproximadamente 230 genomas de cianobacterias disponibles hasta la fecha y se han detectado 34 especies que los contienen (Figura 5.2.1). En todos los casos, a excepción de *Anabaena* y *Nostoc* sp. PCC 7524, en la que el agrupamiento se localiza en su plásmido pNOS7524.01, las agrupaciones identificadas se albergan en el cromosoma. Los agrupamientos de las distintas especies muestran variabilidad en cuanto al número de genes *trn* (de 32 en *Phormidesmis* sp. BC1401 a 7 genes en el caso de *Leptolyngbya* sp. NIES 2104) y al tipo de tRNA que estos codifican. No obstante existen rasgos conservados reconocibles como la presencia de un gen *trnD* al inicio y de genes *trnF*, *trnQ* y *trnP* en la zona central de casi todos los agrupamientos, que indican un probable origen evolutivo común. En el árbol de la figura 5.2.1 se muestran las especies que contienen agrupamientos *trn*. Se observa que (1) la mayoría de las cianobacterias carecen de este agrupamiento, (2) existen linajes en los que varias especies contienen el agrupamiento y (3) el agrupamiento está presente en especies muy distantes en cuanto a su relación filogenética. El origen evolutivo del agrupamiento *trn* de las cianobacterias es incierto. Algunas observaciones indican que podría haberse adquirido por transferencia horizontal (TH) (ver abajo). La similitud del agrupamiento *trn* de las distintas especies de cianobacteria sugiere un único evento de adquisición por parte de una cianobacteria ancestral seguido de múltiples eventos de pérdida en distintos linajes. Alternativamente, la distribución actual del agrupamiento en el árbol filogenético de las especies puede deberse a múltiples eventos de TH intra-*phylum* o al hecho menos probable de que cianobacterias de distintos linajes hubieran adquirido el agrupamiento de forma independiente.

Una observación interesante es que en 22 de las 34 cianobacterias con el agrupamiento *trn*, éste va precedido de un gen (*all8564* en *Anabaena*) que codifica para una nucleasa de la familia HNH (señaladas con un asterisco en el árbol de la figura 5.2.1), y en otras

tres cianobacterias dicho gen se encuentre insertado en medio del agrupamiento. El hecho de que en el patógeno Gram-positivo *Mycobacterium abscessus* exista un agrupamiento de 35 genes de tRNA vecinos a un gen de una nucleasa HNH sugiere que las cianobacterias podrían haber adquirido por TH un segmento de DNA que contuviese el agrupamiento *trn* y el gen de la nucleasa desde un donador que podría estar relacionado con *M. abscessus*.

En este trabajo se muestran datos que sugieren que en cianobacterias el gen de la nucleasa podría tener una relación funcional con el agrupamiento. Además de la conservación de la sintenia, se ha observado en *Anabaena* una regulación similar del gen *all8564* y el operón *trn* en presencia de metil viológeno (Figura 5.1.16). Aunque con la información de la que se dispone no es posible deducir cuál puede ser esta relación, trabajamos actualmente con la siguiente hipótesis: un rasgo anómalo de algunos genes del operón *trn* es que incluyen la secuencia CCA en el extremo 3'. En cianobacterias, los precursores de los tRNAs no portan esta secuencia y se procesan en 3' por la RNasaZ, cuya acción se inhibe precisamente por la secuencia CCA (Ceballos-Chávez & Vioque, 2005; Puerto-Galan & Vioque, 2012). Ello implica que, al menos en *Anabaena*, los tRNAs que contienen esta secuencia deben ser procesados por otra nucleasa, pues se ha observado que se aminoacilan *in vivo* (Puerto-Galan & Vioque, 2012). Dado que el posible producto del gen *all8564* es una endonucleasa de la familia HNH, podría ser ésta la encargada del procesamiento de los tRNAs que portan la secuencia CCA.

Otra observación interesante es la presencia de genes que cifran transposasas en zonas flanqueantes de los agrupamientos *trn*. Ello sugiere una posible relación de estos agrupamientos con elementos genéticos móviles.

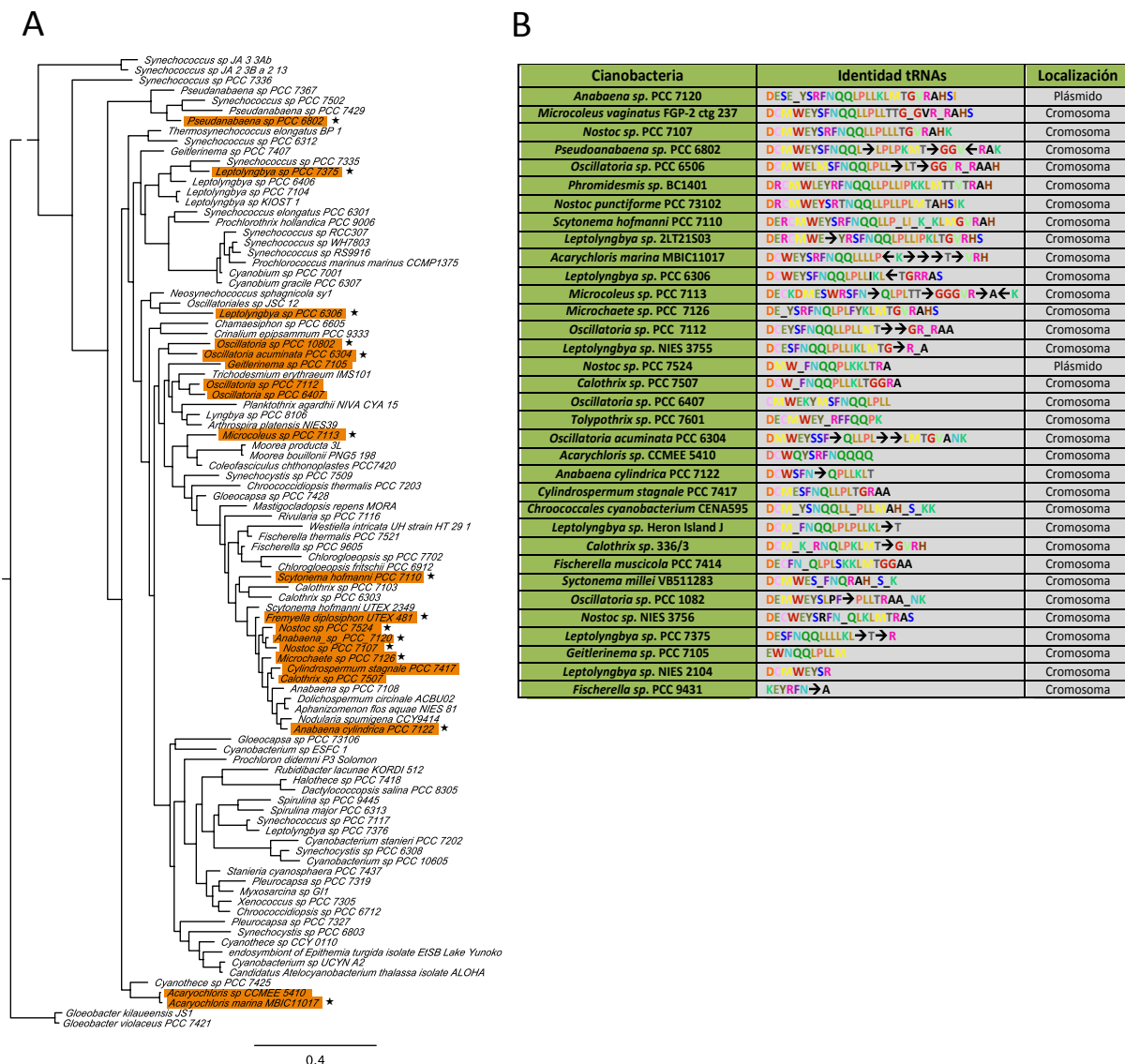


Figura 5.2.1.- Presencia de agrupamientos de genes *trn* en las cianobacterias. (A) Árbol filogenético de especies de cianobacterias basado en la secuencia de los genes de rRNA 23S y 16S (Santamaría-Gómez *et al.*, 2016). Con un fondo naranja se indican las cianobacterias para las que se ha detectado la presencia del agrupamiento de genes *trn*. Con un asterisco se indican las cianobacterias en las que el agrupamiento está precedido por el gen de una nucleasa HNH homóloga a *all8564* de *Anabaena*. **(B)** Tabla en la que se detallan todas las cianobacterias en las que se ha identificado el agrupamiento de genes *trn*. Se indica el nombre de la cianobacteria, el orden de los genes (en base a la identidad del aminoácido correspondiente al anticodón de cada tRNA) y la localización del agrupamiento en el genoma de la cianobacteria. Con un fin ilustrativo se usa un código de color específico para cada aminoácido. Con una flecha se indica la presencia de una ORF cuyo sentido está indicado por el de la flecha. Con el símbolo “_” se indica la existencia de un espacio intergénico con un tamaño comprendido entre 100 y 200 pb. Nótese que el número de cianobacterias listadas en la tabla es superior a las indicadas en la figura (A) debido a que el árbol filogenético se realizó con secuencias de un subconjunto de cianobacterias representativas de los distintos linajes.

5.2.2.- Los tRNAs del operón se acumulan en condiciones de estrés

El bajísimo nivel de expresión de los tRNAs del operón *trn* en células de *Anabaena* en condiciones estándar de cultivo, de órdenes de magnitud inferior al de los tRNAs codificados en el cromosoma, llevó a proponer que este agrupamiento podría ser meramente un vestigio

evolutivo afuncional en vías de desaparición (Puerto-Galan & Vioque, 2012). En este trabajo se muestra que *Anabaena* incrementa entre 20 y 25 veces la expresión del operón *trn* en presencia de agentes que inducen estrés oxidativo como el metil viológeno o el peróxido de hidrógeno (Figura 5.1.10). También se presentan resultados que muestran inducción del operón en condiciones de estrés nutricional por limitación de nitrógeno (inducida con MSX, figura 5.1.11), limitación de carbono (Figura 5.1.12) o de metales divalentes (inducida mediante incubación con el quelante TPEN, figura 5.1.13). Uno de los efectos de la limitación de carbono es la producción de ión superóxido con electrones procedentes del PSI de forma similar al metil viológeno (Herbert *et al.*, 1992), lo cual podría relacionar la inducción observada en condiciones de limitación de carbono con el estrés oxidativo.

Entre los estímulos que inducen la expresión del operón *trn* destacan los antibióticos que afectan al ribosoma. El nivel de inducción provocado por estos es de órdenes de magnitud (de 10^2 a 10^3) superior al obtenido con otros estímulos (Figuras 5.1.21 y 5.1.22). La expresión de los genes *trn* cromosómicos no se afecta en cambio por la adición de estos antibióticos. La inducción del operón *trn* parece responder específicamente a antibióticos que afectan al ribosoma, pues otros antibióticos que producen un retardo similar en el crecimiento pero que actúan sobre otras dianas no inducen la expresión del operón. Este es el caso de la penicilina G, que inhibe la deposición en la pared celular de mureína, o de antibióticos probados por otros miembros del laboratorio como la ciprofloxacina y el ácido nalidíxico, que inhiben la DNA girasa y en consecuencia la replicación del DNA, o la berberina, que inhibe la formación del anillo de división celular.

Los antibióticos que inducen la expresión del agrupamiento tienen un modo de acción muy distinto. Por ejemplo, los aminoglicósidos como la neomicina y la espectinomicina inhiben la reacción de translocación y la separación de las subunidades del ribosoma en la fase de reciclaje, también inducen traducción ambigua al disminuir la afinidad por el aminoacil-tRNA legítimo en el sitio A (Wilson, 2014). La tetraciclina y la estreptomicina también se unen a la subunidad 30S e interfieren con el acoplamiento del aminoacil-tRNA en el sitio A. El cloranfenicol se une al centro peptidil transferasa de la subunidad 50S inhibiendo la formación del enlace peptídico. La eritromicina es un macrólido que se une a la subunidad grande e inhibe la elongación de la cadena peptídica naciente (Wilson, 2014). Lo que es común a todos estos antibióticos es que inhiben la función del ribosoma bloqueando la traducción.

La observación de que la inhibición de la traducción provoca una intensa expresión del operón sugiere que la inducción observada en presencia de agentes oxidantes o estrés nutricional podría ser un efecto secundario, esto es, tales estímulos podrían provocar en último término una inhibición parcial de la traducción que a su vez provocaría la expresión del

operón. Ello es consistente con la ralentización del ribosoma descrita en otras bacterias en diversas condiciones de estrés (Jin *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015).

5.2.3.- Regulación de la expresión de los tRNAs del operón

Los resultados obtenidos indican que la expresión del operón *trn* está regulada a nivel transcripcional, aunque también podría haber mecanismos adicionales de regulación. Para indagar sobre ello se identificaron los promotores aguas arriba del operón. La región que precede al *tsp1*, situado 80 pb aguas arriba del extremo 5' del operón, contiene secuencias muy similares a las de las cajas -35 y -10 del promotor consenso dependiente de σ^{70} , separadas por un espaciamiento óptimo de 17 nt. Cabría esperar por tanto una alta afinidad de la RNA polimerasa por este promotor. Sin embargo, el nivel de expresión observado para el operón *trn* en condiciones estándar de cultivo es bajísimo, de lo que se deduce que este promotor se encuentra muy probablemente regulado por represión. Esto es consistente con la intensidad de las bandas observadas en los experimentos de 5'-RACE (Figura 5.1.14B), que es mayor en condiciones de inducción, lo que apoya que este promotor está regulado. El sitio de inicio de la transcripción *tsp2*, identificado 329 pb aguas arriba del gen *all8564* vecino al operón *trn* (Figura 5.1.14), va precedido de secuencias -35 y -10 reconocibles con un espaciamiento de 18 nt. Como se indica arriba, se ha observado una regulación similar del operón *trn* y el gen *all8564* en presencia de metil viológeno. Es interesante destacar que en sus promotores se ha detectado respectivamente las secuencias TAATACAttATGTA_gTA y TAATACAagATGTAtTA (en gris en la figura 5.2.2) en una posición que solapa con la caja -10. Estas secuencias son palindrómicas y muy similares entre sí, lo que podría sugerir que se trata de un sitio de unión para un represor común.

```

tsp1   GCCCTTGACACCTTGTAATACATTATGTAGTATATATGTAGTGAAGCA
tsp2   TAGTAGACAACATATAATACAAGATGTATTATTAAAAGTATCTTAAT

```

Figura 5.2.2.- Alineamiento de los promotores del operón *trn*. El alineamiento de la caja -10 (en verde) de ambos promotores permite definir una secuencia muy similar (señalada con un sombreado gris). En naranja se representa la posible caja -35. Con una raya se indican los nucleótidos conservados.

Los ensayos de 5'-RACE demostraron la existencia de transcritos solapantes entre el gen *all8564* y el operón *trn*. Ello hace pensar que no existe un terminador de la transcripción eficaz en la zona intergénica, lo que hace que la RNA polimerasa procedente del *tsp2* invada el operón *trn*.

Algunos de los estímulos que inducen la expresión del operón *trn* disparan rutas señaladoras mediadas por reguladores bien caracterizados en *Anabaena*. Uno de estos

reguladores es Zur, que controla la expresión de genes que responden a la deficiencia de zinc tras la adición del quelante TPEN (Napolitano *et al.*, 2012). Excepto en el gen XC2976 de *Xanthomonas campestris* (Huang *et al.*, 2008), Zur actúa como represor en todos los genes de las muchas bacterias en las que se ha caracterizado. En *Anabaena* los genes regulados por Zur muestran una inducción constitutiva en el mutante MN38 carente de Zur (Figura 5.1.17). Ello no se observa para el operón *trn*, de lo que se podría deducir que no está regulado por Zur. Ello es consistente con la ausencia de sitios de unión de Zur en los promotores identificados. Puesto que el TPEN no sólo secuestra zinc, sino también otros metales divalentes, podría ser un regulador específico de otro metal el que mediara la regulación del operón. No obstante, es muy llamativo que el nivel de expresión observado en el mutante MN38 tras la adición de TPEN sea considerablemente menor al observado en la estirpe silvestre. Ello podría obedecer a un funcionamiento general deficiente de las células del mutante o a que Zur participe de un modo indirecto ejerciendo en este caso una regulación positiva del operón *trn*.

Otro de los estímulos que provocan una inducción en la expresión de los genes del operón *trn* es la limitación de carbono. En *Anabaena* se ha identificado la proteína PacR, un factor de transcripción tipo LysR, como el regulador global de los genes implicados en la asimilación de carbono (Picossi *et al.*, 2015). En un mutante carente de este regulador los niveles de transcrito del operón *trn* eran indetectables no sólo en bajo carbono sino también en presencia de metil viológeno (Figura 5.1.18). Incluso el nivel basal de expresión del operón es indetectable en el mutante *pacR*, lo que indica que la presencia de PacR es necesaria para la expresión del operón. En el promotor que precede al operón *trn* existen secuencias TN₁₁A que podrían ser posibles sitios de unión de reguladores de tipo LysR (Parsek *et al.*, 1994), lo que podría indicar la participación directa de PacR en la regulación de la expresión del operón *trn*. No obstante, se ha descrito que PacR regula a su vez a 21 factores de transcripción (Picossi *et al.*, 2015), por lo que no puede descartarse su participación de forma indirecta controlando la expresión de reguladores secundarios. Por otro lado, ensayos preliminares realizados por otros miembros del laboratorio han mostrado que el factor de transcripción DevH tiene afinidad por la secuencia del promotor del operón *trn*. Interesantemente, DevH está codificado por la ORF contigua a la de PacR. Ello podría sugerir una posible relación de ambas proteínas en la ruta de regulación de la expresión del operón *trn*, algo que requiere de estudios adicionales.

Aunque existen muchos aspectos que se desconocen acerca de la regulación del operón, la implicación de distintos reguladores que responden a diversas condiciones de estrés sugiere la convergencia de varias vías de respuesta sobre la regulación del operón (Figura 5.2.3), lo cual indica que la producción de los tRNAs que forman parte del operón es importante para la adaptación a estas condiciones.

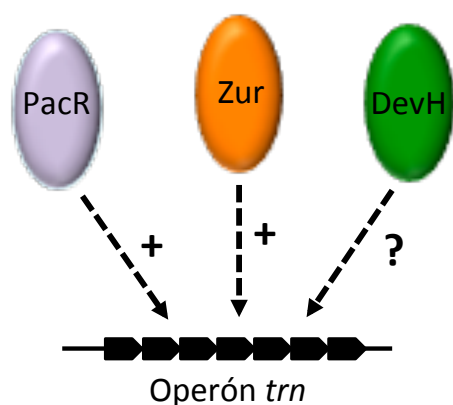


Figura 5.2.3.- Posible modelo de regulación de la expresión del operón *trn*. Hipotético esquema de regulación en el que están implicados los factores transcripcionales PacR (violeta), Zur (naranja) y DevH (verde).

En la actualidad, los conocimientos acerca de la regulación de la expresión de genes *trn* en bacterias es escaso. En condiciones normales de crecimiento los genes que codifican tRNAs se expresan a un alto nivel. En eucariotas la transcripción de los genes *trn* corre a cargo de la RNA polimerasa III y tiene lugar por lo general a partir de promotores intragénicos (Reynolds, 1995; Zhang *et al.*, 2011). Existen situaciones fisiológicas en las que es necesario modular la cantidad de tRNAs presentes en la célula. Eucariotas y procariotas siguen estrategias diferentes a la hora de controlar la cantidad de tRNAs que se producen en la célula. En eucariotas cuando la cantidad de tRNAs debe disminuir se dispara una respuesta consistente en la retirada de tRNAs por transporte retrógrado al núcleo, que puede ir acompañado de su rotura en dos mitades o su inactivación transitoria por corte del extremo aceptor, mientras que en procariotas se produce una degradación irreversible (Huang & Hopper, 2016). En bacterias se ha observado que en general los niveles de tRNA correlacionan con los de rRNA y que ambos responden simultáneamente a algunos estímulos. En bacterias modelo como *E. coli* y *Bacillus subtilis* está bien establecido que los niveles de tRNA son directamente proporcionales a la tasa de crecimiento y que disminuyen por la limitación de aminoácidos o en condiciones de estrés oxidativo (Jinks-Robertson *et al.*, 1983; Durfee *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2015). También se ha encontrado una correlación entre los niveles de tRNAs en función de su anticodón, de modo que los tRNAs que traducen los codones más frecuentes son más abundantes en fase exponencial (Emilsson & Kurland, 1990; Dong *et al.*, 1996; Puri *et al.*, 2014). A pesar de los numerosos estudios, los mecanismos moleculares de regulación no se han empezado a dilucidar hasta muy recientemente y aún permanecen en buena parte sin caracterizar (Dittmar *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2015).

En estas bacterias modelo, las fluctuaciones en el nivel de tRNA son modestas, de un máximo de 10 veces, lo que contrasta con los tRNAs codificados en el operón *trn* de *Anabaena* cuyos niveles pueden variar de 2 a 3 órdenes de magnitud.

5.2.4.- Consecuencias fisiológicas de la expresión de los tRNAs del operón

Uno de los objetivos de este trabajo es aportar información sobre la función del operón *trn*. Aunque la función principal del tRNA es la síntesis proteica, cada vez son más las funciones alternativas que se describen para esta molécula (Kirchner & Ignatova, 2015; Shepherd & Ibba, 2015). El mutante JS75, que expresa el operón *trn* bajo un promotor regulable por la fuente de nitrógeno, ha permitido analizar las consecuencias de su expresión de forma aislada sin la interferencia que supone tratar con agentes inductores que provocan simultáneamente otras respuestas en la célula. Uno de los efectos de la expresión del operón es la variación en la composición de pigmentos. El contenido en clorofila y ficobiliproteínas en el mutante JS75 es menor de forma proporcional al nivel de expresión del operón *trn* (Figura 5.1.4). El déficit en el contenido de ficobiliproteínas no parece deberse a un aumento de su tasa de degradación mediada por *nblA*. Es posible que las diferencias observadas en la pigmentación se deban por tanto a alteraciones en la ruta de síntesis. Es interesante destacar que en cianobacterias el primer intermediario de la síntesis de tetrapirroles, entre los que se incluyen la clorofila, el grupo hemo, las ficobilinas y la vitamina B₁₂, es precisamente el Glu-tRNA^{Glu} (Brzezowski *et al.*, 2015). El operón *trn* incluye dos genes *trnE* que codifican tRNA^{Glu}. El tRNA^{Glu}-UUC(2) carece de los determinantes de identidad U11:A24 y U13:G22, que sirven para su reconocimiento por la GluRS (Giegé *et al.*, 1998), por lo que es posible que este tRNA no se reconozca adecuadamente por su aaRS legítima. Ello podría dar lugar a que no se cargue o que sea reconocido por otra aaRS que lo cargaría con un aminoácido ilegítimo. La presencia en el citoplasma de un tRNA^{Glu} desacilado o mal-acilado podría afectar negativamente a la síntesis de tetrapirroles.

El tRNA^{Glu}-UUC(2) no es el único tRNA del operón que carece de algunos determinantes de identidad. Otros tRNAs codificados en el operón divergen en secuencia y estructura respecto a los isoaceptores codificados en el cromosoma. Los ejemplos más claros son los de los tRNAs^{Leu} y los tRNAs^{Ser} del operón. Los determinantes de identidad de los tRNAs de leucina y serina no se encuentran en el brazo del anticodón como en la mayoría de tRNAs, sino que son los nucleótidos del brazo variable así como la conformación global de éste lo que permite a la aaRS correspondiente reconocer el tRNA adecuado. En el caso de los tRNAs^{Leu} y tRNAs^{Ser} del operón, el brazo variable es muy corto (Figura 5.1.6), lo que sugiere que la LeuRS y SerRS podrían no reconocer eficazmente estos tRNAs. Otros casos son el tRNA^{Gln}-CUG(2) que no presenta el par de bases G3:C70 que en *E. coli* es esencial para su correcta aminoacilación o el tRNA^{Phe}-GAA(2), que carece del par de bases G27:C43 que la PheRS reconoce para aminoacilar el tRNA^{Phe} con fenilalanina (Giegé *et al.*, 1998). No obstante, se ha comprobado

que en *Anabaena* muchos de estos tRNAs se aminoacilan *in vivo* (Puerto-Galan & Vioque, 2012), lo que lleva a considerar que podrían ser reconocidos por una aaRS no legítima y ser cargados con un aminoácido que no corresponde a su anticodón. La incorporación de estos aminoacil-tRNAs mal-acilados a la síntesis proteica introduciría mutaciones en la secuencia de proteínas durante la traducción. Los ensayos de crecimiento de *Anabaena* silvestre y el mutante JS75 en medios de cultivo con altas concentraciones de un aminoácido mostraron de forma repetitiva diferencias de crecimiento favorables al silvestre cuando se suplementó con lisina y valina (Figura 5.1.7). Ello podría sugerir que alguno de los 26 tRNAs del operón se mal-acila con valina o lisina, de forma que un exceso de estos aminoácidos es tóxico para el mutante JS75 que sobreexpresa el operón.

Los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento en presencia de aminoácidos, junto con las diferencias estructurales y de secuencia detectadas en los tRNAs del operón respecto a los del cromosoma, llevan a plantear la hipótesis de que los tRNAs del operón inducen traducción ambigua en la célula. Estudios recientes han demostrado que células de los tres dominios de la vida no solo toleran un cierto grado de error durante la traducción (Reynolds *et al.*, 2010), sino que en algunas condiciones de estrés se produce un incremento de esta tasa de error, produciéndose lo que se conoce como traducción ambigua (*mistranslation*), que puede ser beneficioso para la célula (Ribas de Pouplana *et al.*, 2014). Este fenómeno puede derivar del malfuncionamiento de algún componente de la maquinaria de traducción o por la oxidación de aminoácidos en el citoplasma que se acaban incorporando a las proteínas (Ling & Soll, 2010; Wu *et al.*, 2014; Bullwinkle *et al.*, 2014). Ello está de acuerdo con la visión clásica de la traducción ambigua como un proceso celular aberrante. No obstante, se ha demostrado que en algunos casos la traducción ambigua confiere una ventaja selectiva a la célula, permitiendo la supervivencia de la población en condiciones desfavorables (Fan *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2014; Schwartz & Pan, 2016; Schwartz *et al.*, 2016). También se ha demostrado que la inducción de traducción ambigua de forma artificial confiere en algunos casos ventajas en el crecimiento o resistencia a antibióticos (Bacher *et al.*, 2007; Javid *et al.*, 2014). Los mecanismos de inducción de traducción ambigua son diversos. En algunos casos se produce por un deficiente funcionamiento de los mecanismos de edición de las aaRSs (Ling & Soll, 2010; Wu *et al.*, 2014; Shepherd & Ibba, 2014). Probablemente el mecanismo mejor caracterizado es la mal-metionilación (*mismethionilation*), un fenómeno que ocurre en condiciones de estrés oxidativo en células procariotas y eucariotas (Jones *et al.*, 2011; Netzer *et al.*, 2009; Wiltrout *et al.*, 2012) y que consiste en la pérdida de especificidad de la MetRS, que reconoce algunos tRNAs ilegítimos y los carga con metionina. Puesto que estos tRNAs son específicos de aminoácidos polares, la incorporación ilegítima de metionina ocurre de forma

preferente en regiones superficiales de la proteína, lo que lleva consigo una mayor resistencia al estrés oxidativo (Netzer *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2015). En otros casos, el efecto beneficioso de la traducción ambigua se cree que derivaría de la creación de variabilidad en el proteoma, que en condiciones severas de estrés podría permitir la supervivencia de algunos individuos de una población (Ribas de Pouplana *et al.*, 2014).

Durante algún tiempo se dudaba si la inducción de traducción ambigua era simplemente una consecuencia inevitable del estrés o si era un proceso programado por la célula (Ribas de Pouplana *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado que en *E. coli* se regula la pérdida de especificidad de la MetRS mediante la modificación de dos residuos de lisina que se succinilan en anaerobiosis o en presencia de antibióticos (Schwartz *et al.*, 2016). En caso de que la expresión de los tRNAs del operón *trn* indujera traducción ambigua en *Anabaena*, supondría un segundo mecanismo molecular de inducción programada de este fenómeno.

Por otro lado, se ha descrito que un incremento artificial del nivel de tRNAs en *E. coli* protege a la célula del estrés oxidativo (Zhong *et al.*, 2015), ello sugiere que otro mecanismo alternativo de acción de los tRNAs de operón podría ser el aumento del nivel de tRNA total en la célula. Este aumento podría contribuir a aliviar el atasco del ribosoma que se produce en condiciones de estrés (Zhong *et al.*, 2015), lo que sería consistente con la observación de algunos tRNAs del operón *trn* en polisomas de *Anabaena* (Figura 5.1.26). Por otro lado, no es descartable que un aumento del nivel de tRNAs constituya una señal reconocible por la célula, que podría disparar la respuesta estricta (*stringent sesponse*). También es posible que algún tRNA del operón *trn* actúe individualmente como señalizador al aumentar su nivel (Shepherd & Ibba, 2015). Tampoco se puede descartar que la finalidad de la expresión del operón *trn* sea ajustar la población de tRNAs al uso de codones de proteínas específicas de estrés. Para comprobar esto se tendría que identificar el proteoma específico de las condiciones de estrés en las que se induce el operón.

Por tanto, los tRNAs codificados en el operón *trn* podrían actuar sobre la fisiología de la célula por mecanismos diversos, induciendo alteraciones en la síntesis de tetrapirroles, induciendo traducción ambigua, provocando un incremento general en el nivel de tRNAs o favoreciendo la traducción de determinados codones. Es posible incluso que estos efectos se produzcan simultáneamente, por lo que la repercusión en la fisiología celular de la expresión del operón *trn* sería amplia y diversa.

En cualquiera de estos casos, los resultados que se presentan en este trabajo indican que la inducción del operón *trn* es un fenómeno programado por la célula que probablemente forma parte de una respuesta adaptativa amplia que permite la supervivencia de la población en determinadas condiciones de estrés. Resultados de otros miembros del laboratorio que han

mostrado que el operón *trn* confiere tolerancia antibióticos como cloranfenicol, estreptomicina o tetraciclina corroboran esta visión.

Se puede decir por tanto que el operón *trn* de *Anabaena* es un ejemplo de cómo un elemento externo y potencialmente dañino adquirido por transferencia horizontal ha sido integrado a lo largo de la evolución en la fisiología celular para que actúe en beneficio de la célula.

6 CONCLUSIONES

- I. La existencia de aaRSs^C es un fenómeno extendido en el *phylum* de las cianobacterias. Aproximadamente un tercio de los genomas secuenciados contiene al menos una aaRS^C.
- II. *Anabaena* muestra una distribución asimétrica de aaRSs, con 19 enzimas en la fracción soluble y una anclada a la membrana tilacoidal.
- III. La ValRS^C de *Anabaena* interacciona a través de su dominio CAAD con la F₀F₁-ATP sintasa.
- IV. La relocalización de ValRS^C hacia los polos del heterocisto de *Anabaena* es un fenómeno irreversible que sigue una pauta secuencial. La acumulación de ValRS^C en los polos ocurre por la yuxtaposición de varios fenómenos como la inserción de proteína de nueva síntesis, el desplazamiento de la proteína en la membrana y posiblemente el desplazamiento de las membranas hacia los polos.
- V. El operón *trn* de *Anabaena* se induce en múltiples condiciones de estrés. En su regulación parecen converger varias vías en las que estarían involucradas los reguladores PacR y Zur.
- VI. Los tRNAs codificados en el operón *trn* se encuentra en la fracción polisómica y probablemente participan en traducción.
- VII. La expresión de los tRNAs del operón *trn* tiene consecuencias fisiológicas múltiples provocando alteraciones en los pigmentos y posiblemente traducción ambigua. Ello puede ser necesario para la supervivencia de la célula en condiciones de estrés.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.G., (2000) Symbiotic interactions. In: The ecology of cyanobacteria. Springer, pp. 523-561.
- Agirrezabala, X., I.S. Fernández, A.C. Kelley, D.G. Cartón, V. Ramakrishnan & M. Valle, (2013) The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. *EMBO reports* **14**: 811-816.
- Agris, P.F., F.A. Vendeix & W.D. Graham, (2007) tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *Journal of molecular biology* **366**: 1-13.
- Akins, R.A. & A.M. Lambowitz, (1987) A protein required for splicing group I introns in *Neurospora* mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. *Cell* **50**: 331-345.
- Aldridge, C., P. Cain & C. Robinson, (2009) Protein transport in organelles: protein transport into and across the thylakoid membrane. *FEBS journal* **276**: 1177-1186.
- An, S. & K. Musier-Forsyth, (2004) Trans-editing of Cys-tRNA^{Pro} by *Haemophilus influenzae* YbaK protein. *J Biol Chem* **279**: 42359-42362.
- Apirion, D. & A. Miczak, (1993) RNA processing in prokaryotic cells. *Bioessays* **15**: 113-120.
- Armbruster, U., M. Labs, M. Pribil, S. Viola, W. Xu, M. Scharfenberg, A.P. Hertle, U. Rojahn, P.E. Jensen, F. Rappaport, P. Joliot, P. Dormann, G. Wanner & D. Leister, (2013) Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 Proteins Modify Thylakoid Architecture by Inducing Membrane Curvature. *Plant Cell* **25**: 2661-2678.
- Awai, K., (2016) Thylakoid Development and Galactolipid Synthesis in Cyanobacteria. In: Lipids in Plant and Algae Development. Springer, pp. 85-101.
- Bacher, J.M., W.F. Waas, D. Metzgar, V. de Crecy-Lagard & P. Schimmel, (2007) Genetic code ambiguity confers a selective advantage on *Acinetobacter baylyi*. *J Bacteriol* **189**: 6494-6496.
- Bailey, S. & A. Grossman, (2008) Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting. *Photochemistry and Photobiology* **84**: 1410-1420.
- Bailly, M., M. Blaise, B. Lorber, H.D. Becker & D. Kern, (2007) The transamidosome: a dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Molecular cell* **28**: 228-239.
- Bandyopadhyay, A.K. & M.P. Deutscher, (1971) Complex of aminoacyl-transfer RNA synthetases. *Journal of molecular biology* **60**: 113-122.
- Bartosik, A.A., K. Lasocki, J. Mierzejewska, C.M. Thomas & G. Jagura-Burdzy, (2004) ParB of *Pseudomonas aeruginosa*: interactions with its partner ParA and its target parS and specific effects on bacterial growth. *Journal of bacteriology* **186**: 6983-6998.
- Bec, G., P. Kerjan & J.P. Waller, (1994) Reconstitution in vitro of the valyl-tRNA synthetase-elongation factor (EF) 1 beta gamma delta complex. Essential roles of the NH2-terminal extension of valyl-tRNA synthetase and of the EF-1 delta subunit in complex formation. *J Biol Chem* **269**: 2086-2092.
- Bekker, A., H. Holland, P. Wang & D. Rumble III, (2004) Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* **427**: 117.
- Bensing, B.A., B.J. Meyer & G.M. Dunny, (1996) Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7794-7799.
- Berg, P., (1958) The chemical synthesis of amino acyl adenylates. *J. Biol, Chem* **233**: 608-611.
- Black, T.A., Y. Cai & C.P. Wolk, (1993) Spatial expression and autoregulation of hetR, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Molecular microbiology* **9**: 77-84.
- Black, T.A. & C.P. Wolk, (1994) Analysis of a Het-mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing. *Journal of bacteriology* **176**: 2282-2292.

- Blackhart, B.D. & D.R. Zusman, (1985) "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**: 8767-8770.
- Blaise, M., M. Bailly, M. Frechin, M.A. Behrens, F. Fischer, C.L. Oliveira, H.D. Becker, J.S. Pedersen, S. Thirup & D. Kern, (2010) Crystal structure of a transfer ribonucleoprotein particle that promotes asparagine formation. *The EMBO journal* **29**: 3118-3129.
- Bohne, A.-V., S. Schwenkert, B. Grimm & J. Nickelsen, (2016) Roles of Tetratricopeptide Repeat Proteins in Biogenesis of the Photosynthetic Apparatus. *International review of cell and molecular biology* **324**: 187-227.
- Bonfils, G., M. Jaquenoud, S. Bontron, C. Ostrowicz, C. Ungermann & C. De Virgilio, (2012) Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol Cell* **46**: 105-110.
- Boyer, H.W. & D. Roulland-dussoix, (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **41**: 459-472.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Bradley, S. & N. Carr, (1971) Absence of a functional photosystem-II in heterocysts of *Anabaena cylindrica* In: *Journal of General Microbiology*. SOC GENERAL MICROBIOLOGY MARLBOROUGH HOUSE, BASINGSTOKE RD, SPENCERS WOODS, READING RG7 1AE, BERKS, ENGLAND, pp. R13-&.
- Brown, A., I.S. Fernández, Y. Gordiyenko & V. Ramakrishnan, (2016) Ribosome-dependent activation of stringent control. *Nature* **534**: 277-280.
- Bryan, S.J., N.J. Burroughs, D. Shevela, J. Yu, E. Rupprecht, L.N. Liu, G. Mastroianni, Q. Xue, I. Llorente-Garcia, M.C. Leake, L.A. Eichacker, D. Schneider, P.J. Nixon & C.W. Mullineaux, (2014) Localisation and interactions of the Vipp1 protein in cyanobacteria. *Mol Microbiol*.
- Brzezowski, P., A.S. Richter & B. Grimm, (2015) Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1847**: 968-985.
- Buikema, W.J. & R. Haselkorn, (1991) Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes & development* **5**: 321-330.
- Bullwinkle, T.J. & M. Ibba, (2014) Emergence and evolution. *Top Curr Chem* **344**: 43-87.
- Bullwinkle, T.J., N.M. Reynolds, M. Raina, A. Moghal, E. Matsa, A. Rajkovic, H. Kayadibi, F. Fazlollahi, C. Ryan, N. Howitz, K.F. Faull, B.A. Lazazzera & M. Ibba, (2014) Oxidation of cellular amino acid pools leads to cytotoxic mistranslation of the genetic code. *Elife* **3**.
- Burnap, R.L., M. Hagemann & A. Kaplan, (2015) Regulation of CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria. *Life* **5**: 348-371.
- Cai, Y.P. & C.P. Wolk, (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J Bacteriol* **172**: 3138-3145.
- Callahan, S.M. & W.J. Buikema, (2001) The role of HetN in maintenance of the heterocyst pattern in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol* **40**: 941-950.
- Caprara, M.G., V. Lehnert, A.M. Lambowitz & E. Westhof, (1996) A tyrosyl-tRNA synthetase recognizes a conserved tRNA-like structural motif in the group I intron catalytic core. *Cell* **87**: 1135-1145.
- Cardemil, L. & C.P. Wolk, (1979) The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit. *Journal of Biological Chemistry* **254**: 736-741.
- Carter, C.W. & W.L. Duax, (2002) Did tRNA synthetase classes arise on opposite strands of the same gene? *Molecular cell* **10**: 705-708.

- Castro de Moura, M., F. Miro, J.M. Han, S. Kim, A. Celada & L. Ribas de Pouplana, (2011) *Entamoeba* lysyl-tRNA synthetase contains a cytokine-like domain with chemokine activity towards human endothelial cells. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1398.
- Ceballos-Chávez, M. & A. Vioque, (2005) Sequence-dependent cleavage site selection by RNase Z from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 33461-33469.
- Cech, T.R., (2000) The ribosome is a ribozyme. *Science* **289**: 878-879.
- Cen, S., H. Javanbakht, M. Niu & L. Kleiman, (2004) Ability of wild-type and mutant lysyl-tRNA synthetase to facilitate tRNA^{Lys} incorporation into human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* **78**: 1595-1601.
- Chandrasekaran, S.N., G.G. Yardimci, O. Erdogan, J. Roach & C.W. Carter, (2013) Statistical evaluation of the Rodin–Ohno hypothesis: Sense/antisense coding of ancestral Class I and II aminoacyl-tRNA synthetases. *Molecular biology and evolution* **30**: 1588-1604.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.G. Higgins & J.D. Thompson, (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**: 3497-3500.
- Cohen, S.E., M.L. Erb, J. Selimkhanov, G. Dong, J. Hasty, J. Pogliano & S.S. Golden, (2014) Dynamic localization of the cyanobacterial circadian clock proteins. *Current Biology* **24**: 1836-1844.
- Collier, J.L. & A. Grossman, (1994) A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *The EMBO journal* **13**: 1039.
- Corrales-Guerrero, L., V. Mariscal, E. Flores & A. Herrero, (2013) Functional dissection and evidence for intercellular transfer of the heterocyst-differentiation PatS morphogen. *Mol Microbiol* **88**: 1093-1105.
- Corrales-Guerrero, L., A. Tal, R. Arbel-Goren, V. Mariscal, E. Flores, A. Herrero & J. Stavans, (2015) Spatial fluctuations in expression of the heterocyst differentiation regulatory gene hetR in *Anabaena* filaments. *PLoS Genet* **11**: e1005031.
- Crick, F., (1956) On degenerate template and the adaptor hypothesis: a note for the RNA tie club. In., pp.
- Cudny, H. & M.P. Deutscher, (1980) Apparent involvement of ribonuclease D in the 3'processing of tRNA precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**: 837-841.
- Curatti, L., L. Giarrocco & G.L. Salerno, (2006) Sucrose synthase and RuBisCo expression is similarly regulated by the nitrogen source in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. *Planta* **223**: 891-900.
- Curnow, A.W., M. Ibba & D. Soll, (1996) tRNA-dependent asparagine formation. *Nature* **382**: 589-590.
- Cusack, S., C. Berthet-Colominas, M. Härtlein, N. Nassar & R. Leberman, (1990) A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* **347**: 249-255.
- Cvetesic, N. & I. Gruic-Sovulj, (2016) Synthetic and editing reactions of aminoacyl-tRNA synthetases using cognate and non-cognate amino acid substrates. *Methods*.
- David, A., N. Netzer, M.B. Strader, S.R. Das, C.Y. Chen, J. Gibbs, P. Pierre, J.R. Bennink & J.W. Yewdell, (2011) RNA binding targets aminoacyl-tRNA synthetases to translating ribosomes. *J Biol Chem* **286**: 20688-20700.
- Davies, B., (1976) Carotenoids. *Chemistry and biochemistry of plant pigments (TW Goodwin (ed.) Academic Press, London, UK*: 38-165.
- Deana, A. & J.G. Belasco, (2005) Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes & development* **19**: 2526-2533.
- Delarue, M. & D. Moras, (1993) The aminoacyl-tRNA synthetase family: modules at work. *Bioessays* **15**: 675-687.

- DeRuyter, Y.S. & P. Fromme, (2008) Molecular Structure of the Photosynthetic Apparatus. In: The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution. A. Herrero & E. Flores (eds). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 217-269.
- Di Roberto, R.B. & S.G. Peisajovich, (2014) The role of domain shuffling in the evolution of signaling networks. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **322**: 65-72.
- Dittmar, K.A., E.M. Mobley, A.J. Radek & T. Pan, (2004) Exploring the regulation of tRNA distribution on the genomic scale. *Journal of molecular biology* **337**: 31-47.
- Dock-Bregeon, A., R. Sankaranarayanan, P. Romby, J. Caillet, M. Springer, B. Rees, C.S. Francklyn, C. Ehresmann & D. Moras, (2000) Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase. The class II solution to the double discrimination problem. *Cell* **103**: 877-884.
- Dock-Bregeon, A.C., B. Rees, A. Torres-Larios, G. Bey, J. Caillet & D. Moras, (2004) Achieving error-free translation; the mechanism of proofreading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution. *Mol Cell* **16**: 375-386.
- Dong, H., L. Nilsson & C.G. Kurland, (1996) Co-variation of trna abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *Journal of molecular biology* **260**: 649-663.
- Dong, J., H. Qiu, M. Garcia-Barrio, J. Anderson & A.G. Hinnebusch, (2000) Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular cell* **6**: 269-279.
- Doolittle, R.F., (1995) The multiplicity of domains in proteins. *Annual review of biochemistry* **64**: 287-314.
- Drin, G. & B. Antonny, (2010) Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett* **584**: 1840-1847.
- Duchene, A.M., A. Giritch, B. Hoffmann, V. Cognat, D. Lancelin, N.M. Peeters, M. Zaepfel, L. Marechal-Drouard & I.D. Small, (2005) Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16484-16489.
- Dulic, M., N. Cveticic, J.J. Perona & I. Gruic-Sovulj, (2010) Partitioning of tRNA-dependent editing between pre-and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 23799-23809.
- Dunham, K.R. & B.R. Selman, (1981) Regulation of spinach chloroplast coupling factor 1 ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry* **256**: 212-218.
- Dunkle, J.A. & J.H. Cate, (2013) An Introduction to the Structure and Function of the Ribosome. *EcoSal Plus* **5**.
- Durfee, T., A.-M. Hansen, H. Zhi, F.R. Blattner & D.J. Jin, (2008) Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **190**: 1084-1096.
- El Yacoubi, B., M. Bailly & V. de Crécy-Lagard, (2012) Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annual review of genetics* **46**: 69-95.
- Elhai, J., A. Veprikitskiy, A.M. Muro-Pastor, E. Flores & C.P. Wolk, (1997) Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *J Bacteriol* **179**: 1998-2005.
- Elhai, J. & C.P. Wolk, (1988) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**: 747-754.
- Emilsson, V. & C.G. Kurland, (1990) Growth rate dependence of transfer RNA abundance in *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **9**: 4359.
- Eriani, G., M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff & D. Moras, (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**: 203-206.
- Espinosa, J., K. Forchhammer, S. Burillo & A. Contreras, (2006) Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Molecular microbiology* **61**: 457-469.

- Espinosa, J., F. Rodríguez-Mateos, P. Salinas, V.F. Lanza, R. Dixon, F. de la Cruz & A. Contreras, (2014) PipX, the coactivator of NtcA, is a global regulator in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: E2423-E2430.
- Fan, Y., J. Wu, M.H. Ung, N. De Lay, C. Cheng & J. Ling, (2015) Protein mistranslation protects bacteria against oxidative stress. *Nucleic acids research*: gku1404.
- Fischer, F., J.L. Huot, B. Lorber, G. Diss, T.L. Hendrickson, H.D. Becker, J. Lapointe & D. Kern, (2012) The asparagine-transamidosome from *Helicobacter pylori*: a dual-kinetic mode in non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase safeguards the genetic code. *Nucleic acids research* **40**: 4965-4976.
- Flaherty, B.L., D.B. Johnson & J.W. Golden, (2014) Deep sequencing of HetR-bound DNA reveals novel HetR targets in *Anabaena* sp. strain PCC7120. *BMC microbiology* **14**: 255.
- Flores, E. & A. Herrero, (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In: *The molecular biology of cyanobacteria*. Springer, pp. 487-517.
- Flores, E. & A. Herrero, (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat Rev Microbiol* **8**: 39-50.
- Fonvielle, M., M. Chemama, R. Villet, M. Lecerf, A. Bouhss, J.-M. Valéry, M. Ethève-Quelquejeu & M. Arthur, (2009) Aminoacyl-tRNA recognition by the FemXWv transferase for bacterial cell wall synthesis. *Nucleic acids research*: gkn1039.
- Frain, K.M., D. Gangl, A. Jones, J.A. Zedler & C. Robinson, (2016) Protein translocation and thylakoid biogenesis in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1857**: 266-273.
- Francklyn, C. & P. Schimmel, (1989) Aminoacylation of RNA minihelices with alanine. *Nature* **337**: 478-481.
- Francklyn, C.S., E.A. First, J.J. Perona & Y.M. Hou, (2008) Methods for kinetic and thermodynamic analysis of aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods* **44**: 100-118.
- Frechin, M., L. Enkler, E. Tetaud, D. Laporte, B. Senger, C. Blancard, P. Hammann, G. Bader, S. Clauder-Munster, L.M. Steinmetz, R.P. Martin, J.P. di Rago & H.D. Becker, (2014) Expression of nuclear and mitochondrial genes encoding ATP synthase is synchronized by disassembly of a multisynthetase complex. *Mol Cell* **56**: 763-776.
- Gao, H. & X. Xu, (2009) Depletion of Vipp1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 affects photosynthetic activity before the loss of thylakoid membranes. *FEMS microbiology letters* **292**: 63-70.
- Gegenheimer, P. & D. Apirion, (1981) Processing of procaryotic ribonucleic acid. *Microbiological reviews* **45**: 502.
- Gherib, R., H.M. Dokainish & J.W. Gauld, (2013) Multi-Scale Computational Enzymology: Enhancing Our Understanding of Enzymatic Catalysis. *International journal of molecular sciences* **15**: 401-422.
- Giddings, T.H. & L.A. Staehelin, (1979) Changes in thylakoid structure associated with the differentiation of heterocysts in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **546**: 373-382.
- Giegé, R., M. Sissler & C. Florentz, (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic acids research* **26**: 5017-5035.
- Giordano, M., J. Beardall & J.A. Raven, (2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 99-131.
- Glazer, A.N., (1976) Phycocyanins: structure and function. In: *Photochemical and photobiological reviews*. Springer, pp. 71-115.
- Godinic, V., M. Mocibob, S. Rocak, M. Ibba & I. Weygand-Durasevic, (2007) Peroxin Pex21p interacts with the C-terminal noncatalytic domain of yeast seryl-tRNA synthetase and forms a specific ternary complex with tRNA(Ser). *FEBS J* **274**: 2788-2799.

- Godinic-Mikulcic, V., J. Jaric, B.J. Greber, V. Franke, V. Hodnik, G. Anderluh, N. Ban & I. Weygand-Durasevic, (2014) Archaeal aminoacyl-tRNA synthetases interact with the ribosome to recycle tRNAs. *Nucleic acids research*: gku164.
- Godinic-Mikulcic, V., J. Jaric, C.D. Hausmann, M. Ibba & I. Weygand-Durasevic, (2011) An archaeal tRNA-synthetase complex that enhances aminoacylation under extreme conditions. *J Biol Chem* **286**: 3396-3404.
- Gonzalez-Esquer, C., J. Smarda, R. Rippka, S. Axen, G. Guglielmi, M. Gugger & C. Kerfeld, (2016) Cyanobacterial ultrastructure in light of genomic sequence data. *Photosynthesis research* **129**: 147-157.
- Goodenbour, J.M. & T. Pan, (2006) Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic acids research* **34**: 6137-6146.
- Green, N.J., F.J. Grundy & T.M. Henkin, (2010) The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. *FEBS letters* **584**: 318-324.
- Gresser, M.J., J.A. Myers & P.D. Boyer, (1982) Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F1 adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model. *Journal of Biological Chemistry* **257**: 12030-12038.
- Griese, M., C. Lange & J. Soppa, (2011) Ploidy in cyanobacteria. *FEMS microbiology letters* **323**: 124-131.
- Grosjean, H., (2009) DNA and RNA modification enzymes: structure, mechanism, function and evolution. Landes bioscience.
- Grosjean, H., V. de Crécy-Lagard & C. Marck, (2010) Deciphering synonymous codons in the three domains of life: coevolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS letters* **584**: 252-264.
- Gruic-Sovulj, I., J. Rokov-Plavec & I. Weygand-Durasevic, (2007) Hydrolysis of non - cognate aminoacyl-adenylates by a class II aminoacyl tRNA synthetase lacking an editing domain. *FEBS letters* **581**: 5110-5114.
- Gruic-Sovulj, I., N. Uter, T. Bullock & J.J. Perona, (2005) tRNA-dependent aminoacyl-adenylate hydrolysis by a nonediting class I aminoacyl-tRNA synthetase. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 23978-23986.
- Gualerzi, C.O. & C.L. Pon, (2015) Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72**: 4341-4367.
- Guo, M. & P. Schimmel, (2013) Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nature chemical biology* **9**: 145-153.
- Guo, M., P. Schimmel & X.L. Yang, (2010a) Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions. *FEBS Lett* **584**: 434-442.
- Guo, M. & X.-L. Yang, (2013) Architecture and metamorphosis. In: *Aminoacyl-tRNA Synthetases in Biology and Medicine*. Springer, pp. 89-118.
- Guo, M., X.L. Yang & P. Schimmel, (2010b) New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 668-674.
- Guth, E., S.H. Connolly, M. Bovee & C.S. Francklyn, (2005) A substrate-assisted concerted mechanism for aminoacylation by a class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **44**: 3785-3794.
- Gutu, A. & D.M. Kehoe, (2012) Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria. *Molecular plant* **5**: 1-13.
- Guzzo, C.M. & D.C. Yang, (2008) Lysyl-tRNA synthetase interacts with EF1alpha, aspartyl-tRNA synthetase and p38 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 718-723.
- Han, J.M., S.J. Jeong, M.C. Park, G. Kim, N.H. Kwon, H.K. Kim, S.H. Ha, S.H. Ryu & S. Kim, (2012) Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* **149**: 410-424.

- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580.
- Haseltine, W.A. & R. Block, (1973) Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**: 1564-1568.
- Hausmann, C.D. & M. Ibba, (2008) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 705-721.
- Hausmann, C.D., M. Praetorius-Ibba & M. Ibba, (2007) An aminoacyl-tRNA synthetase:elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic Acids Res* **35**: 6094-6102.
- Havrylenko, S. & M. Mirande, (2015) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes in evolution. *International journal of molecular sciences* **16**: 6571-6594.
- He, W., G. Bai, H. Zhou, N. Wei, N.M. White, J. Lauer, H. Liu, Y. Shi, C.D. Dumitru & K. Lettieri, (2015) CMT2D neuropathy is linked to the neomorphic binding activity of glycyl-tRNA synthetase. *Nature* **526**: 710-714.
- Heinemann, I.U., D. Söll & L. Randau, (2010) Transfer RNA processing in archaea: unusual pathways and enzymes. *FEBS letters* **584**: 303-309.
- Heinz, S., A. Rast, L. Shao, A. Gutu, I.L. Gügel, E. Heyno, B. Rengstl, S. Viola, M.M. Nowaczyk & D. Leister, (2016) Thylakoid Membrane Architecture in *Synechocystis* Depends on CurT, a Homolog of the Granal CURVATURE THYLAKOID1 Proteins. *The Plant Cell*: tpc. 00491.02016.
- Henkin, T.M. & C. Yanofsky, (2002) Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* **24**: 700-707.
- Hennig, R., J. Heidrich, M. Saur, L. Schmäser, S.J. Roeters, N. Hellmann, S. Woutersen, M. Bonn, T. Weidner & J. Markl, (2015) IM30 triggers membrane fusion in cyanobacteria and chloroplasts. *Nature communications* **6**.
- Herbert, S.K., G. Samson, D.C. Fork & D.E. Laudenbach, (1992) Characterization of damage to photosystems I and II in a cyanobacterium lacking detectable iron superoxide dismutase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 8716-8720.
- Herdman, M., M. Janvier, R. Rippka & R.Y. Stanier, (1979) Genome size of cyanobacteria. *microbiology* **111**: 73-85.
- Herrero, A., A.M. Muro-Pastor & E. Flores, (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol* **183**: 411-425.
- Herrero, A., A.M. Muro-Pastor, A. Valladares & E. Flores, (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 469-487.
- Herrero, A., J. Stavans & E. Flores, (2016) The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **40**: 831-854.
- Hess, W.R., (2011) Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Current opinion in microbiology* **14**: 608-614.
- Hirono-Hara, Y., H. Noji, M. Nishiura, E. Muneyuki, K.Y. Hara, R. Yasuda, K. Kinoshita & M. Yoshida, (2001) Pause and rotation of F1-ATPase during catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 13649-13654.
- Hisabori, T., E.-I. Sunamura, Y. Kim & H. Konno, (2013) The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery. *Antioxidants & redox signaling* **19**: 1846-1854.
- Hoagland, M.B., (1955) An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* **16**: 288-289.
- Hoagland, M.B., M.L. Stephenson, J.F. Scott, L.I. Hecht & P.C. Zamecnik, (1958) A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem* **231**: 241-257.

- Hoffmann, L., J. Komárek & J. Kaštovský, (2005) System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)–state in 2004. *Algological Studies* **117**: 95-115.
- Hohmann-Marriott, M.F. & R.E. Blankenship, (2011) Evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 515-548.
- Hu, Z., A. Mukherjee, S. Pichoff & J. Lutkenhaus, (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 14819-14824.
- Huang, D.-L., D.-J. Tang, Q. Liao, H.-C. Li, Q. Chen, Y.-Q. He, J.-X. Feng, B.-L. Jiang, G.-T. Lu & B. Chen, (2008) The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic acids research* **36**: 4295-4309.
- Huang, H.-Y. & A.K. Hopper, (2016) Multiple layers of stress-induced regulation in tRNA biology. *Life* **6**: 16.
- Hussain, T., J.L. Llácer, B.T. Wimberly, J.S. Kieft & V. Ramakrishnan, (2016) Large-Scale Movements of IF3 and tRNA during Bacterial Translation Initiation. *Cell* **167**: 133-144. e113.
- Ibba, M., A.W. Curnow & D. Soll, (1997a) Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. *Trends Biochem Sci* **22**: 39-42.
- Ibba, M., S. Morgan, A.W. Curnow, D.R. Pridmore, U.C. Vothknecht, W. Gardner, W. Lin, C.R. Woese & D. Soll, (1997b) A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science* **278**: 1119-1122.
- Ibba, M. & D. Söll, (2004) Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes & development* **18**: 731-738.
- Illangasekare, M. & M. Yarus, (1999) A tiny RNA that catalyzes both aminoacyl-RNA and peptidyl-RNA synthesis. *Rna* **5**: 1482-1489.
- Ito, T. & S. Yokoyama, (2010) Two enzymes bound to one transfer RNA assume alternative conformations for consecutive reactions. *Nature* **467**: 612-616.
- Javid, B., F. Sorrentino, M. Toosky, W. Zheng, J.T. Pinkham, N. Jain, M. Pan, P. Deighan & E.J. Rubin, (2014) Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 1132-1137.
- Jin, Y., S. Jin & W. Wu, (2016) Regulation of bacterial gene expression by ribosome stalling and rescuing. *Current genetics* **62**: 309-312.
- Jinks-Robertson, S., R.L. Gourse & M. Nomura, (1983) Expression of rRNA and tRNA genes in *Escherichia coli*: evidence for feedback regulation by products of rRNA operons. *Cell* **33**: 865-876.
- Johnson, E.A. & R.E. McCarty, (2002) The carboxyl terminus of the ϵ subunit of the chloroplast ATP synthase is exposed during illumination. *Biochemistry* **41**: 2446-2451.
- Jones, L.J., R. Carballido-López & J. Errington, (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Jones, T.E., R.W. Alexander & T. Pan, (2011) Misacylation of specific nonmethionyl tRNAs by a bacterial methionyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 6933-6938.
- Joshua, S. & C.W. Mullineaux, (2004) Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. *Plant physiology* **135**: 2112-2119.
- Jung, P.P., A. Friedrich, J.-L. Souciet, V. Louis, S. Potier, J. de Montigny & J. Schacherer, (2010) Complete mitochondrial genome sequence of the yeast *Pichia farinosa* and comparative analysis of closely related species. *Current genetics* **56**: 507-515.
- Kaňa, R., (2013) Mobility of photosynthetic proteins. *Photosynthesis research* **116**: 465-479.

- Kaneko, T., Y. Nakamura, C.P. Wolk, T. Kuritz, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, A. Ishikawa, K. Kawashima & T. Kimura, (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* **8**: 205-213.
- Kaplan, A. & L. Reinhold, (1999) CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual review of plant biology* **50**: 539-570.
- Karradt, A., J. Sobanski, J. Mattow, W. Lockau & K. Baier, (2008) NblA, a key protein of phycobilisome degradation, interacts with ClpC, a HSP100 chaperone partner of a cyanobacterial Clp protease. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 32394-32403.
- Kato, S., M. Yoshida & Y. Kato-Yamada, (2007) Role of the ϵ subunit of thermophilic F₁-ATPase as a sensor for ATP. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 37618-37623.
- Katz, A., S. Elgamal, A. Rajkovic & M. Ibba, (2016) Non-canonical roles of tRNAs and tRNA mimics in bacterial cell biology. *Molecular microbiology* **101**: 545-558.
- Kerfeld, C.A. & M.R. Melnicki, (2016) Assembly, function and evolution of cyanobacterial carboxysomes. *Current opinion in plant biology* **31**: 66-75.
- Kim, D.G., J.W. Choi, J.Y. Lee, H. Kim, Y.S. Oh, J.W. Lee, Y.K. Tak, J.M. Song, E. Razin, S.H. Yun & S. Kim, (2012) Interaction of two translational components, lysyl-tRNA synthetase and p40/37LRP, in plasma membrane promotes laminin-dependent cell migration. *FASEB J* **26**: 4142-4159.
- Kirchhoff, H., S. Haferkamp, J.F. Allen, D.B. Epstein & C.W. Mullineaux, (2008) Protein diffusion and macromolecular crowding in thylakoid membranes. *Plant physiology* **146**: 1571-1578.
- Kirchhoff, H., R.M. Sharpe, M. Herbstova, R. Yarbrough & G.E. Edwards, (2013) Differential mobility of pigment-protein complexes in granal and agranal thylakoid membranes of C₃ and C₄ plants. *Plant physiology* **161**: 497-507.
- Kirchner, S. & Z. Ignatova, (2015) Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nature Reviews Genetics* **16**: 98-112.
- Ko, Y.-G., E.-K. Kim, T. Kim, H. Park, H.-S. Park, E.-J. Choi & S. Kim, (2001) Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutamyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 6030-6036.
- Konno, H., T. Murakami-Fuse, F. Fujii, F. Koyama, H. Ueoka-Nakanishi, C.G. Pack, M. Kinjo & T. Hisabori, (2006) The regulator of the F₁ motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F₁-ATPase by the epsilon subunit. *EMBO J* **25**: 4596-4604.
- Kopečna, J., J. Komenda, L. Bucinska & R. Sobotka, (2012) Long-term acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light is accompanied by an enhanced production of chlorophyll that is preferentially channeled to trimeric photosystem I. *Plant physiology* **160**: 2239-2250.
- Korostelev, A.A., (2011) Structural aspects of translation termination on the ribosome. *Rna* **17**: 1409-1421.
- Krause, F. & H. Seelert, (2008) Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 19**: Unit 19 18.
- Kroll, D., K. Meierhoff, N. Bechtold, M. Kinoshita, S. Westphal, U.C. Vothknecht, J. Soll & P. Westhoff, (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 4238-4242.
- Kroth, P.G., (2015) The biodiversity of carbon assimilation. *Journal of plant physiology* **172**: 76-81.
- Kumar, R.K. & M. Yarus, (2001) RNA-catalyzed amino acid activation. *Biochemistry* **40**: 6998-7004.

- Kumazaki, S., M. Akari & M. Hasegawa, (2013) Transformation of thylakoid membranes during differentiation from vegetative cell into heterocyst visualized by microscopic spectral imaging. *Plant physiology* **161**: 1321-1333.
- Kunkel, D.D., (1982) Thylakoid centers: structures associated with the cyanobacterial photosynthetic membrane system. *Archives of Microbiology* **133**: 97-99.
- Kwon, N.H., T. Kang, J.Y. Lee, H.H. Kim, H.R. Kim, J. Hong, Y.S. Oh, J.M. Han, M.J. Ku & S.Y. Lee, (2011) Dual role of methionyl-tRNA synthetase in the regulation of translation and tumor suppressor activity of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 19635-19640.
- Kyriacou, S.V. & M.P. Deutscher, (2008) An important role for the multienzyme aminoacyl-tRNA synthetase complex in mammalian translation and cell growth. *Mol Cell* **29**: 419-427.
- Labouesse, M., (1990) The yeast mitochondrial leucyl-tRNA synthetase is a splicing factor for the excision of several group I introns. *Molecular and General Genetics MGG* **224**: 209-221.
- Labunskyy, V.M., D.L. Hatfield & V.N. Gladyshev, (2014) Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews* **94**: 739-777.
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**: 680-685.
- Lang, N.J. & P. Fay, (1971) The heterocysts of blue-green algae II. Details of ultrastructure. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **178**.
- Lang, N.J., R.D. Simon & C.P. Wolk, (1972) Correspondence of cyanophycin granules with structured granules in *Anabaena cylindrica*. *Archiv für Mikrobiologie* **83**: 313-320.
- Laslett, D. & B. Canback, (2004) ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research* **32**: 11-16.
- Laursen, B.S., H.P. Sørensen, K.K. Mortensen & H.U. Sperling-Petersen, (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**: 101-123.
- Lee, J.Y., D.G. Kim, B.G. Kim, W.S. Yang, J. Hong, T. Kang, Y.S. Oh, K.R. Kim, B.W. Han, B. Hwang, B. Kang, M.S. Kang, M.H. Kim, N.H. Kwon & S. Kim, (2014) Promiscuous methionyl-tRNA synthetase mediates adaptive mistranslation against oxidative stresses. *J Cell Sci.*
- Lee, N., Y. Bessho, K. Wei, J.W. Szostak & H. Suga, (2000) Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nature Structural & Molecular Biology* **7**: 28-33.
- Li, G., A. Becam, P. Slonimski & C. Herbert, (1996) In vitro mutagenesis of the mitochondrial leucyl tRNA synthetase of *Saccharomyces cerevisiae* shows that the suppressor activity of the mutant proteins is related to the splicing function of the wild-type protein. *Molecular and General Genetics MGG* **252**: 667-675.
- Li, Y., A. Dabrazhynetskaya, B. Youngren & S. Austin, (2004) The role of Par proteins in the active segregation of the P1 plasmid. *Molecular microbiology* **53**: 93-102.
- Liberton, M., L.E. Page, W.B. O'Dell, H. O'Neill, E. Mamontov, V.S. Urban & H.B. Pakrasi, (2013) Organization and flexibility of cyanobacterial thylakoid membranes examined by neutron scattering. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 3632-3640.
- Ling, J., N. Reynolds & M. Ibba, (2009) Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control. *Annu Rev Microbiol* **63**: 61-78.
- Ling, J. & D. Soll, (2010) Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4028-4033.
- Liu, H., H. Zhang, D.M. Niedzwiedzki, M. Prado, G. He, M.L. Gross & R.E. Blankenship, (2013) Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* **342**: 1104-1107.

- Liu, L.-N., (2016) Distribution and dynamics of electron transport complexes in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1857**: 256-265.
- Liu, L.-N., S.J. Bryan, F. Huang, J. Yu, P.J. Nixon, P.R. Rich & C.W. Mullineaux, (2012) Control of electron transport routes through redox-regulated redistribution of respiratory complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 11431-11436.
- Liu, Q. & K. Fredrick, (2016) Intersubunit bridges of the bacterial ribosome. *Journal of molecular biology* **428**: 2146-2164.
- Liu, Z., O. Vargas-Rodriguez, Y. Goto, E.M. Novoa, L. Ribas de Pouplana, H. Suga & K. Musier-Forsyth, (2015) Homologous trans-editing factors with broad tRNA specificity prevent mistranslation caused by serine/threonine misactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Luque, I. & J.A. Ochoa de Alda, (2014) CURT1,CAAD-containing aaRSs, thylakoid curvature and gene translation. *Trends Plant Sci* **19**: 63-66.
- Luque, I., J.A. Ochoa De Alda, C. Richaud, G. Zabulon, J.C. Thomas & J. Houmard, (2003) The NblA protein from the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix* PCC 7601: regulation of its expression and interactions with phycobilisome components. *Mol Microbiol* **50**: 1043-1054.
- Luque, I., M.L. Riera-Alberola, A. Andujar & J.A. Ochoa de Alda, (2008) Intraphylum diversity and complex evolution of cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Biol Evol* **25**: 2369-2389.
- Machnicka, M.A., A. Olchowik, H. Grosjean & J.M. Bujnicki, (2014) Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. *RNA biology* **11**: 1619-1629.
- Mackinney, G., (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* **140**: 315-322.
- Magnuson, A. & T. Cardona, (2016) Thylakoid membrane function in heterocysts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1857**: 309-319.
- Margulis, L., (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*: 21-38.
- Mariscal, V., A. Herrero & E. Flores, (2007) Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. *Mol Microbiol* **65**: 1139-1145.
- Markwell, M.A.K., S.M. Hass, L.L. Bieber & N.E. Tolbert, (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**: 206-210.
- Martinez-Rodriguez, L., O. Erdogan, M. Jimenez-Rodriguez, K. Gonzalez-Rivera, T. Williams, L. Li, V. Weinreb, M. Collier, S.N. Chandrasekaran & X. Ambroggio, (2015) Functional Class I and II amino acid-activating enzymes can be coded by opposite strands of the same gene. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 19710-19725.
- Meeks, J.C. & J. Elhai, (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 94-121; table of contents.
- Mehler, A.H., (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **33**: 65-77.
- Mei, Y., J. Yong, H. Liu, Y. Shi, J. Meinkoth, G. Dreyfuss & X. Yang, (2010) tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Molecular cell* **37**: 668-678.
- Merino-Puerto, V., V. Mariscal, C.W. Mullineaux, A. Herrero & E. Flores, (2010) Fra proteins influencing filament integrity, diazotrophy and localization of septal protein SepJ in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *Mol Microbiol* **75**: 1159-1170.
- Merino-Puerto, V., V. Mariscal, H. Schwarz, I. Maldener, C.W. Mullineaux, A. Herrero & E. Flores, (2011a) FraH is required for reorganization of intracellular membranes during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **193**: 6815-6823.

- Merino-Puerto, V., H. Schwarz, I. Maldener, V. Mariscal, C.W. Mullineaux, A. Herrero & E. Flores, (2011b) FraC/FraD-dependent intercellular molecular exchange in the filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium, *Anabaena* sp. *Mol Microbiol* **82**: 87-98.
- Mignot, T., J.P. Merlie & D.R. Zusman, (2005) Regulated pole-to-pole oscillations of a bacterial gliding motility protein. *Science* **310**: 855-857.
- Mignot, T. & J.W. Shaevitz, (2008) Active and passive mechanisms of intracellular transport and localization in bacteria. *Current opinion in microbiology* **11**: 580-585.
- Minajigi, A. & C.S. Francklyn, (2010) Aminoacyl transfer rate dictates choice of editing pathway in threonyl-tRNA synthetase. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 23810-23817.
- Mirande, M., (2010) Processivity of translation in the eukaryote cell: role of aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* **584**: 443-447.
- Mitome, N., T. Suzuki, S. Hayashi & M. Yoshida, (2004) Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: indication of noninteger 10: 3 H⁺/ATP ratio and permissive elastic coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12159-12164.
- Mohamed, A. & C. Jansson, (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant molecular biology* **13**: 693-700.
- Moine, H., P. Romby, M. Springer, M. Grunberg-Manago, J.P. Ebel, B. Ehresmann & C. Ehresmann, (1990) *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase and tRNA(Thr) modulate the binding of the ribosome to the translational initiation site of the thrS mRNA. *J Mol Biol* **216**: 299-310.
- Moirangthem, L.D., S. Bhattacharya, K. Stensjö, P. Lindblad & J. Bhattacharya, (2014) A high constitutive catalase activity confers resistance to methyl viologen-promoted oxidative stress in a mutant of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *Applied microbiology and biotechnology* **98**: 3809-3818.
- Montgomery, B.L., (2016) Mechanisms and fitness implications of photomorphogenesis during chromatic acclimation in cyanobacteria. *Journal of experimental botany*: erw206.
- Montoya, J.P., C.M. Holl, J.P. Zehr, A. Hansen, T.A. Villareal & D.G. Capone, (2004) High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* **430**: 1027-1032.
- Motorin, Y.A., A.D. Wolfson, D. Lohr, A.F. Orlovsky & K.L. Gladilin, (1991) Purification and properties of a high-molecular-mass complex between Val-tRNA synthetase and the heavy form of elongation factor 1 from mammalian cells. *Eur J Biochem* **201**: 325-331.
- Mullineaux, C.W., (2004) FRAP analysis of photosynthetic membranes. *Journal of experimental botany* **55**: 1207-1211.
- Mullineaux, C.W., (2014) Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1837**: 503-511.
- Mullineaux, C.W., V. Mariscal, A. Nenninger, H. Khanum, A. Herrero, E. Flores & D.G. Adams, (2008) Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. *EMBO J* **27**: 1299-1308.
- Mullineaux, C.W., M.J. Tobin & G.R. Jones, (1997) Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature* **390**: 421-424.
- Muñoz-Marín, M.d.C., I. Luque, M.V. Zubkov, P.G. Hill, J. Diez & J.M. García-Fernández, (2013) *Prochlorococcus* can use the Pro1404 transporter to take up glucose at nanomolar concentrations in the Atlantic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 8597-8602.
- Muro-Pastor, A.M., A. Valladares, E. Flores & A. Herrero, (2002) Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Mol Microbiol* **44**: 1377-1385.

- Murray, N.E., W. Brammar & K. Murray, (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Molecular and General Genetics MGG* **150**: 53-61.
- Murry, M.A., A.G. Olafsen & J.R. Benemann, (1981) Oxidation of diaminobenzidine in the heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Current Microbiology* **6**: 201-206.
- Murry, M.A. & C.P. Wolk, (1989) Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. *Archives of Microbiology* **151**: 469-474.
- Myasnikov, A.G., A. Simonetti, S. Marzi & B.P. Klaholz, (2009) Structure–function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Current opinion in structural biology* **19**: 300-309.
- Naganuma, M., S.-i. Sekine, R. Fukunaga & S. Yokoyama, (2009) Unique protein architecture of alanyl-tRNA synthetase for aminoacylation, editing, and dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 8489-8494.
- Nagy, G., D. Posselt, L. Kovács, J.K. Holm, M. Szabó, B. Ughy, L. Rosta, J. Peters, P. Timmins & G. Garab, (2011) Reversible membrane reorganizations during photosynthesis in vivo: revealed by small-angle neutron scattering. *Biochemical Journal* **436**: 225-230.
- Napolitano, M., M.A. Rubio, J. Santamaria-Gomez, E. Olmedo-Verd, N.J. Robinson & I. Luque, (2012) Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *J Bacteriol* **194**: 2426-2436.
- Negrutskii, B.S. & M.P. Deutscher, (1991) Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4991-4995.
- Negrutskii, B.S., V.F. Shalak, P. Kerjan, A.V. El'skaya & M. Mirande, (1999) Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1 α in the complex with EF-1H. *J Biol Chem* **274**: 4545-4550.
- Netzer, N., J.M. Goodenbour, A. David, K.A. Dittmar, R.B. Jones, J.R. Schneider, D. Boone, E.M. Eves, M.R. Rosner, J.S. Gibbs, A. Embry, B. Dolan, S. Das, H.D. Hickman, P. Berglund, J.R. Bennink, J.W. Yewdell & T. Pan, (2009) Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. *Nature* **462**: 522-526.
- Nickelsen, J., B. Rengstl, A. Stengel, M. Schottkowski, J. Soll & E. Ankele, (2011) Biogenesis of the cyanobacterial thylakoid membrane system—an update. *FEMS microbiology letters* **315**: 1-5.
- Nirenberg, M., P. Leder, M. Bernfield, R. Brimacombe, J. Trupin, F. Rottman & C. O'neal, (1965) RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **53**: 1161-1168.
- Nirenberg, M.W. & J.H. Matthaei, (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **47**: 1588-1602.
- Nishimura, T., Y. Takahashi, O. Yamaguchi, H. Suzuki, S.i. Maeda & T. Omata, (2008) Mechanism of low CO₂ - induced activation of the cmp bicarbonate transporter operon by a LysR family protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Molecular microbiology* **68**: 98-109.
- Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida & K. Kinosita, (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **386**: 299-302.
- Noll, H., (2008) The discovery of polyribosomes. *Bioessays* **30**: 1220-1234.
- Novoa, E.M., O. Vargas-Rodriguez, S. Lange, Y. Goto, H. Suga, K. Musier-Forsyth & L. Ribas de Pouplana, (2015) Ancestral AlaX Editing Enzymes for Control of Genetic Code Fidelity Are Not tRNA-specific. *J Biol Chem* **290**: 10495-10503.
- Nowicka, B. & J. Kruk, (2016) Powered by light: Phototrophy and photosynthesis in prokaryotes and its evolution. *Microbiological research* **186**: 99-118.

- O'Donoghue, P. & Z. Luthey-Schulten, (2003) On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 550-573.
- Ochoa de Alda, J.A., R. Esteban, M.L. Diago & J. Houmard, (2014) The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nat Commun* **5**: 4937.
- Olmedo-Verd, E., A.M. Muro-Pastor, E. Flores & A. Herrero, (2006) Localized induction of the *ntcA* regulatory gene in developing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **188**: 6694-6699.
- Olmedo-Verd, E., J. Santamaria-Gomez, J.A. Ochoa de Alda, L. Ribas de Pouplana & I. Luque, (2011) Membrane anchoring of aminoacyl-tRNA synthetases by convergent acquisition of a novel protein domain. *J Biol Chem* **286**: 41057-41068.
- Omairi-Nasser, A., R. Haselkorn & J. Austin, (2014) Visualization of channels connecting cells in filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *The FASEB Journal* **28**: 3016-3022.
- Otani, A., B.M. Slike, M.I. Dorrell, J. Hood, K. Kinder, K.L. Ewalt, D. Cheresch, P. Schimmel & M. Friedlander, (2002) A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 178-183.
- Pace, J. & E. McDermott, (1952) Methionine sulfoximine and some enzyme systems involving glutamine. *Nature* **169**: 415-416.
- Palencia, A., T. Crepin, M.T. Vu, T.L. Lincecum, Jr., S.A. Martinis & S. Cusack, (2012) Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 677-684.
- Park, S.J., S.H. Kim, H.S. Choi, Y. Rhee & S.-K. Lim, (2009) Fibroblast growth factor 2-induced cytoplasmic asparaginyl-tRNA synthetase promotes survival of osteoblasts by regulating anti-apoptotic PI3K/Akt signaling. *Bone* **45**: 994-1003.
- Parsek, M.R., R.W. Ye, P. Pun & A.M. Chakrabarty, (1994) Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. *catBC* promoter activation by CatR. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 11279-11284.
- Pascual, A. & A. Vioque, (1999) Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and *Escherichia coli* are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6672-6677.
- Paukstelis, P.J., R. Coon, L. Madabusi, J. Nowakowski, A. Monzingo, J. Robertus & A.M. Lambowitz, (2005) A tyrosyl-tRNA synthetase adapted to function in group I intron splicing by acquiring a new RNA binding surface. *Molecular cell* **17**: 417-428.
- Perona, J.J. & I. Gruic-Sovulj, (2013) Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases. In: *Aminoacyl-tRNA Synthetases in Biology and Medicine*. Springer, pp. 1-41.
- Pham, Y., L. Li, A. Kim, O. Erdogan, V. Weinreb, G.L. Butterfoss, B. Kuhlman & C.W. Carter, (2007) A minimal TrpRS catalytic domain supports sense/antisense ancestry of class I and II aminoacyl-tRNA synthetases. *Molecular cell* **25**: 851-862.
- Picossi, S., E. Flores & A. Herrero, (2015) The LysR-type transcription factor PacR is a global regulator of photosynthetic carbon assimilation in *Anabaena*. *Environ Microbiol* **17**: 3341-3351.
- Pogoryelov, D., J. Yu, T. Meier, J. Vonck, P. Dimroth & D.J. Muller, (2005) The c15 ring of the *Spirulina platensis* F₁-ATP synthase: F₁/F₀ symmetry mismatch is not obligatory. *EMBO reports* **6**: 1040-1044.
- Polycarpo, C., A. Ambrogelly, A. Berube, S.M. Winbush, J.A. McCloskey, P.F. Crain, J.L. Wood & D. Soll, (2004) An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12450-12454.
- Praetorius-Ibba, M., C.D. Hausmann, M. Paras, T.E. Rogers & M. Ibba, (2007) Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **282**: 3680-3687.

- Praetorius-Ibba, M., T.E. Rogers, R. Samson, Z. Kelman & M. Ibba, (2005) Association between Archaeal prolyl- and leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA(Pro) aminoacylation. *J Biol Chem* **280**: 26099-26104.
- Price, G.D., M.R. Badger, F.J. Woodger & B.M. Long, (2008) Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of experimental botany* **59**: 1441-1461.
- Puerto-Galan, L. & A. Vioque, (2012) Expression and processing of an unusual tRNA gene cluster in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett* **337**: 10-17.
- Puri, P., C. Wetzel, P. Saffert, K.W. Gaston, S.P. Russell, J.A. Cordero Varela, P. Vlies, G. Zhang, P.A. Limbach & Z. Ignatova, (2014) Systematic identification of tRNAome and its dynamics in *Lactococcus lactis*. *Molecular microbiology* **93**: 944-956.
- Putney, S.D. & P. Schimmel, (1981) An aminoacyl tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. *Nature* **291**: 632-635.
- Qin, D. & K. Fredrick, (2012) Analysis of polysomes from bacteria. *Methods in enzymology* **530**: 159-172.
- Quevillon, S., J.-C. Robinson, E. Berthonneau, M. Siatecka & M. Mirande, (1999) Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *Journal of molecular biology* **285**: 183-195.
- Raina, M., S. Elgamal, T.J. Santangelo & M. Ibba, (2012) Association of a multi-synthetase complex with translating ribosomes in the archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *FEBS Lett* **586**: 2232-2238.
- Raina, M. & M. Ibba, (2014) tRNAs as regulators of biological processes. *Front Genet* **5**: 171.
- Ramos-Leon, F., V. Mariscal, J.E. Frias, E. Flores & A. Herrero, (2015) Divisome-dependent subcellular localization of cell-cell joining protein SepJ in the filamentous cyanobacterium *Anabaena*. *Mol Microbiol* **96**: 566-580.
- Rampias, T., K. Sheppard & D. Soll, (2010) The archaeal transamidosome for RNA-dependent glutamine biosynthesis. *Nucleic Acids Res* **38**: 5774-5783.
- Randau, L. & D. Söll, (2008) Transfer RNA genes in pieces. *EMBO reports* **9**: 623-628.
- Raskin, D.M. & P.A. de Boer, (1999) MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **181**: 6419-6424.
- Ray, B.K. & D. Apirion, (1981) Transfer RNA precursors are accumulated in *Escherichia coli* in the absence of RNase E. *European Journal of Biochemistry* **114**: 517-524.
- Reed, V.S., M.E. Wastney & D. Yang, (1994) Mechanisms of the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 32932-32936.
- Reed, V.S. & D.C. Yang, (1994) Characterization of a novel N-terminal peptide in human aspartyl-tRNA synthetase. Roles in the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem* **269**: 32937-32941.
- Reynolds, N.M., B.A. Lazazzera & M. Ibba, (2010) Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nat Rev Microbiol* **8**: 849-856.
- Reynolds, W.F., (1995) Developmental stage-specific regulation of *Xenopus* tRNA genes by an upstream promoter element. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 10703-10710.
- Ribas de Pouplana, L., M.A. Santos, J.H. Zhu, P.J. Farabaugh & B. Javid, (2014) Protein mistranslation: friend or foe? *Trends Biochem Sci* **39**: 355-362.
- Ribas de Pouplana, L. & P. Schimmel, (2000) A view into the origin of life: aminoacyl-tRNA synthetases. *Cell Mol Life Sci* **57**: 865-870.

- Ribas de Pouplana, L. & P. Schimmel, (2001a) Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development. *Trends Biochem Sci* **26**: 591-596.
- Ribas de Pouplana, L. & P. Schimmel, (2001b) Two classes of tRNA synthetases suggested by sterically compatible dockings on tRNA acceptor stem. *Cell* **104**: 191-193.
- Rippka, R., (1972) Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* **87**: 93-98.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman & R. Stanier, (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1– 61.
- Rocak, S., I. Landeka & I. Weygand-Durasevic, (2002) Identifying Pex21p as a protein that specifically interacts with yeast seryl-tRNA synthetase. *FEMS Microbiol Lett* **214**: 101-106.
- Rocap, G., F.W. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N.A. Ahlgren, A. Arellano, M. Coleman, L. Hauser & W.R. Hess, (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* **424**: 1042-1047.
- Rodin, S.N. & S. Ohno, (1995) Two types of aminoacyl-tRNA synthetases could be originally encoded by complementary strands of the same nucleic acid. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **25**: 565-589.
- Rodnina, M.V. & W. Wintermeyer, (2016) Protein elongation, co-translational folding and targeting. *Journal of molecular biology* **428**: 2165-2185.
- Ross, W., C.E. Vrentas, P. Sanchez-Vazquez, T. Gaal & R.L. Gourse, (2013) The magic spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Molecular cell* **50**: 420-429.
- Roy, H., K. Dare & M. Ibba, (2009) Adaptation of the bacterial membrane to changing environments using aminoacylated phospholipids. *Mol Microbiol* **71**: 547-550.
- Rubio, M.A., M. Napolitano, J.A. Ochoa de Alda, J. Santamaria-Gomez, C.J. Patterson, A.W. Foster, R. Bru-Martinez, N.J. Robinson & I. Luque, (2015) Trans-oligomerization of duplicated aminoacyl-tRNA synthetases maintains genetic code fidelity under stress. *Nucleic Acids Res* **43**: 9905-9917.
- Rütgers, M. & M. Schroda, (2013) A role of VIPP1 as a dynamic structure within thylakoid centers as sites of photosystem biogenesis? *Plant signaling & behavior* **8**: 637-659.
- Sambrook, J. & D.W. Russell, (2001) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sampath, P., B. Mazumder, V. Seshadri, C.A. Gerber, L. Chavatte, M. Kinter, S.M. Ting, J.D. Dignam, S. Kim, D.M. Driscoll & P.L. Fox, (2004) Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* **119**: 195-208.
- Sánchez-Baracaldo, P., (2015) Origin of marine planktonic cyanobacteria. *Nature Publishing Group. Scientific Reports* **5**: 17418.
- Santamaría-Gómez, J., J.A.O. de Alda, E. Olmedo-Verd, R. Bru-Martínez & I. Luque, (2016) Sub-Cellular Localization and Complex Formation by Aminoacyl-tRNA Synthetases in Cyanobacteria: Evidence for Interaction of Membrane-Anchored ValRS with ATP Synthase. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- Sarcina, M., N. Bouzovitis & C.W. Mullineaux, (2006) Mobilization of photosystem II induced by intense red light in the cyanobacterium *Synechococcus sp* PCC7942. *The Plant Cell* **18**: 457-464.
- Sarcina, M., M.J. Tobin & C.W. Mullineaux, (2001) Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* 7942 Effects of phycobilisome size, temperature, and membrane lipid composition. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 46830-46834.
- Sauerwald, A., W. Zhu, T.A. Major, H. Roy, S. Palioura, D. Jahn, W.B. Whitman, J.R. Yates, M. Ibba & D. Söll, (2005) RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* **307**: 1969-1972.

- Schattner, P., A.N. Brooks & T.M. Lowe, (2005) The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic acids research* **33**: W686-W689.
- Schiffer, S., S. Rösch & A. Marchfelder, (2002) Assigning a function to a conserved group of proteins: the tRNA 3' - processing enzymes. *The EMBO journal* **21**: 2769-2777.
- Schirrmeister, B.E., A. Antonelli & H.C. Bagheri, (2011) The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evol Biol* **11**: 45.
- Schirrmeister, B.E., J.M. de Vos, A. Antonelli & H.C. Bagheri, (2013) Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1791-1796.
- Schirrmeister, B.E., M. Gugger & P.C. Donoghue, (2015) Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology* **58**: 769-785.
- Schmeing, T.M. & V. Ramakrishnan, (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**: 1234-1242.
- Schmidt, E. & P. Schimmel, (1995) Residues in a class I tRNA synthetase which determine selectivity of amino acid recognition in the context of tRNA. *Biochemistry* **34**: 11204-11210.
- Schneider, D., E. Fuhrmann, I. Scholz, W.R. Hess & P.L. Graumann, (2007) Fluorescence staining of live cyanobacterial cells suggest non-stringent chromosome segregation and absence of a connection between cytoplasmic and thylakoid membranes. *BMC Cell Biol* **8**: 39.
- Schon, A., G. Krupp, S. Gough, S. Berry-Lowe, C.G. Kannangara & D. Soll, (1986) The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* **322**: 281-284.
- Schottkowski, M., J. Ratke, U. Oster, M. Nowaczyk & J. Nickelsen, (2009) Pitt, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in light-dependent chlorophyll biosynthesis and thylakoid membrane biogenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular plant* **2**: 1289-1297.
- Schwartz, M.H. & T. Pan, (2016) Function and origin of mistranslation in distinct cellular contexts. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*: 1-15.
- Schwartz, M.H., J.R. Waldbauer, L. Zhang & T. Pan, (2016) Global tRNA misacylation induced by anaerobiosis and antibiotic exposure broadly increases stress resistance in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*: gkw856.
- Seefeldt, L.C., B.M. Hoffman & D.R. Dean, (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual review of biochemistry* **78**: 701-722.
- Sendersky, E., N. Kozier, M. Levi, Y. Garini, Y. Shav - Tal & R. Schwarz, (2014) The proteolysis adaptor, NblA, initiates protein pigment degradation by interacting with the cyanobacterial light-harvesting complexes. *The Plant Journal* **79**: 118-126.
- Shapiro, L., H.H. McAdams & R. Losick, (2009) Why and how bacteria localize proteins. *Science* **326**: 1225-1228.
- Shepherd, J. & M. Ibba, (2013) Direction of aminoacylated transfer RNAs into antibiotic synthesis and peptidoglycan-mediated antibiotic resistance. *FEBS letters* **587**: 2895-2904.
- Shepherd, J. & M. Ibba, (2014) Relaxed substrate specificity leads to extensive tRNA Mischarging by *Streptococcus pneumoniae* class I and Class II aminoacyl-tRNA synthetases. *MBio* **5**: e01656-01614.
- Shepherd, J. & M. Ibba, (2015) Bacterial transfer RNAs. *FEMS microbiology reviews* **39**: 280-300.
- Sherman, D.M., D. Tucker & L.A. Sherman, (2000) Heterocyst development and localization of cyanophycin in N₂-fixing cultures of *Anabaena* sp. pcc 7120 (cyanobacteria). *Journal of Phycology* **36**: 932-941.
- Shi, T. & P.G. Falkowski, (2008) Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 2510-2515.

- Shih, P.M., D. Wu, A. Latifi, S.D. Axen, D.P. Fewer, E. Talla, A. Calteau, F. Cai, N.T. De Marsac & R. Rippka, (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 1053-1058.
- Shih, Y.L. & M. Zheng, (2013) Spatial control of the cell division site by the Min system in *Escherichia coli*. *Environmental microbiology* **15**: 3229-3239.
- Simonetti, A., S. Marzi, L. Jenner, A. Myasnikov, P. Romby, G. Yusupova, B.P. Klaholz & M. Yusupov, (2009) A structural view of translation initiation in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **66**: 423-436.
- Simos, G., A. Segref, F. Fasiolo, K. Hellmuth, A. Shevchenko, M. Mann & E.C. Hurt, (1996) The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J* **15**: 5437-5448.
- Smith, D.R., (2015) The past, present and future of mitochondrial genomics: have we sequenced enough mtDNAs? *Briefings in functional genomics*: elv027.
- Sobotka, R., S. McLean, M. Zuberova, C.N. Hunter & M. Tichy, (2008) The C-terminal extension of ferrochelatase is critical for enzyme activity and for functioning of the tetrapyrrole pathway in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol* **190**: 2086-2095.
- Sokabe, M., T. Ose, A. Nakamura, K. Tokunaga, O. Nureki, M. Yao & I. Tanaka, (2009) The structure of alanyl-tRNA synthetase with editing domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 11028-11033.
- Soll, D. & U. RajBhandary, (1995) tRNA: Structure, biosynthesis and function. *ASM Press*.
- Sorek, R., Y. Zhu, C.J. Creevey, M.P. Francino, P. Bork & E.M. Rubin, (2007) Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science* **318**: 1449-1452.
- Springer, M., M. Graffe, J. Dondon, M. Grunberg-Manago, P. Romby, B. Ehresmann, C. Ehresmann & J.P. Ebel, (1988) Translational control in *E. coli*: the case of threonyl-tRNA synthetase. *Biosci Rep* **8**: 619-632.
- Srinivasan, G., C.M. James & J.A. Krzycki, (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* **296**: 1459-1462.
- Stanier, R. & G. Cohen-Bazire, (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Reviews in Microbiology* **31**: 225-274.
- Stapulionis, R. & M.P. Deutscher, (1995) A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7158-7161.
- Staron, P., K. Forchhammer & I. Maldener, (2011) Novel ATP-driven pathway of glycolipid export involving TolC protein. *J Biol Chem* **286**: 38202-38210.
- Stebegg, R., B. Wurzinger, M. Mikulic & G. Schmetterer, (2012) Chemoheterotrophic growth of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 dependent on a functional cytochrome c oxidase. *Journal of bacteriology* **194**: 4601-4607.
- Stengel, A., I.L. Gügel, D. Hilger, B. Rengstl, H. Jung & J. Nickelsen, (2012) Initial steps of photosystem II de novo assembly and preloading with manganese take place in biogenesis centers in *Synechocystis*. *The Plant Cell* **24**: 660-675.
- Suzuki, T., A. Nakamura, K. Kato, D. Söll, I. Tanaka, K. Sheppard & M. Yao, (2015) Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* transamidosome reveals unique aspects of bacterial tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 382-387.
- Tamura, K., (2015) Origins and early evolution of the tRNA molecule. *Life* **5**: 1687-1699.
- Tawari, B., I.K.M. Ali, C. Scott, M.A. Quail, M. Berriman, N. Hall & C.G. Clark, (2008) Patterns of evolution in the unique tRNA gene arrays of the genus *Entamoeba*. *Molecular biology and evolution* **25**: 187-198.

- Torres-Larios, A., A.C. Dock-Bregeon, P. Romby, B. Rees, R. Sankaranarayanan, J. Caillet, M. Springer, C. Ehresmann, B. Ehresmann & D. Moras, (2002) Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl tRNA synthetase. *Nat Struct Biol* **9**: 343-347.
- Tous, C., M.A. Vega-Palas & A.n. Vioque, (2001) Conditional expression of RNase P in the Cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803 allows detection of precursor RNAs. Insight in the in vivo maturation pathway of transfer and other stable RNAs. *Journal Of Biological Chemistry* **276**: 29059-29066.
- Tran, T.T., H. Belahbib, V. Bonnefoy & E. Talla, (2015) A Comprehensive tRNA Genomic Survey Unravels the Evolutionary History of tRNA Arrays in Prokaryotes. *Genome Biol Evol* **8**: 282-295.
- Traxler, M.F., S.M. Summers, H.T. Nguyen, V.M. Zacharia, G.A. Hightower, J.T. Smith & T. Conway, (2008) The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **68**: 1128-1148.
- Ungerer, J.L., B.S. Pratte & T. Thiel, (2008) Regulation of fructose transport and its effect on fructose toxicity in *Anabaena sp.* *J Bacteriol* **190**: 8115-8125.
- Valladares, A., I. Maldener, A.M. Muro-Pastor, E. Flores & A. Herrero, (2007) Heterocyst development and diazotrophic metabolism in terminal respiratory oxidase mutants of the cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *J Bacteriol* **189**: 4425-4430.
- van de Meene, A.M., M.F. Hohmann-Marriott, W.F. Vermaas & R.W. Roberson, (2006) The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Arch Microbiol* **184**: 259-270.
- Vargas-Rodriguez, O. & K. Musier-Forsyth, (2013) Exclusive use of trans-editing domains prevents proline mistranslation. *J Biol Chem* **288**: 14391-14399.
- Vasilyeva, E.A., I.B. Minkov, A.F. Fitin & A.D. Vinogradov, (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. ADP-specific inhibition as revealed by the steady-state kinetics. *Biochemical Journal* **202**: 9-14.
- Vermaas, W.F., J.A. Timlin, H.D. Jones, M.B. Sinclair, L.T. Nieman, S.W. Hamad, D.K. Melgaard & D.M. Haaland, (2008) In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 4050-4055.
- Von Ballmoos, C., A. Wiedenmann & P. Dimroth, (2009) Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annual review of biochemistry* **78**: 649-672.
- Voorhees, R.M. & V. Ramakrishnan, (2013) Structural Basis of the Translational Elongation Cycle. *Annual review of biochemistry* **82**: 203-236.
- Wakasugi, K. & P. Schimmel, (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **284**: 147-151.
- Wang, H.-L., B.L. Postier & R.L. Burnap, (2004) Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis sp.* PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 5739-5751.
- Weber, J., (2010) Structural biology: Toward the ATP synthase mechanism. *Nature chemical biology* **6**: 794-795.
- Whitton, B.A. & M. Potts, (2002) Introduction to the cyanobacteria. In: The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. B.A. Whitton & M. Potts (eds). New York, Boston, Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, pp. 1-10.
- Wilcox, M., G. Mitchison & R. Smith, (1973) Pattern formation in the blue-green alga, *Anabaena*. *Journal of cell science* **12**: 707-723.
- Williams, T.F., A.C. Mirando, B. Wilkinson, C.S. Francklyn & K.M. Lounsbury, (2013) Secreted Threonyl-tRNA synthetase stimulates endothelial cell migration and angiogenesis. *Scientific reports* **3**: 1317.

- Wilson, D.N., (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 35-48.
- Wiltrout, E., J.M. Goodenbour, M. Frechin & T. Pan, (2012) Misacylation of tRNA with methionine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **40**: 10494-10506.
- Winkenbach, F. & C.P. Wolk, (1973) Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga. *Plant physiology* **52**: 480-483.
- Wittig, I., M. Karas & H. Schagger, (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1215-1225.
- Wittig, I. & H. Schagger, (2008) Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* **8**: 3974-3990.
- Woese, C.R., G.J. Olsen, M. Ibba & D. Soll, (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 202-236.
- Wolk, C., Y. Cai, L. Cardemil, E. Flores, B. Hohn, M. Murry, G. Schmetterer, B. Schrautemeier & R. Wilson, (1988) Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *Journal of bacteriology* **170**: 1239-1244.
- Wu, J., Y. Fan & J. Ling, (2014) Mechanism of oxidant-induced mistranslation by threonyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res* **42**: 6523-6531.
- Xiao, J.-F. & J. Yu, (2007) A scenario on the stepwise evolution of the genetic code. *Genomics, proteomics & bioinformatics* **5**: 143-151.
- Xiong, Y. & T.A. Steitz, (2004) Mechanism of transfer RNA maturation by CCA-adding enzyme without using an oligonucleotide template. *Nature* **430**: 640-645.
- Yadavalli, S.S. & M. Ibba, (2012) Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity. *Adv Protein Chem Struct Biol* **86**: 1-43.
- Yannay-Cohen, N., I. Carmi-Levy, G. Kay, C.M. Yang, J.M. Han, D.M. Kemeny, S. Kim, H. Nechushtan & E. Razin, (2009) LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Mol Cell* **34**: 603-611.
- Yao, P., K. Poruri, S.A. Martinis & P.L. Fox, (2013) Non-catalytic regulation of gene expression by aminoacyl-tRNA synthetases. In: *Aminoacyl-tRNA Synthetases in Biology and Medicine*. Springer, pp. 167-187.
- Yaremchuk, A., I. Kriklivyi, M. Tukalo & S. Cusack, (2002) Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition. *The EMBO journal* **21**: 3829-3840.
- Yoon, H.-S. & J.W. Golden, (1998) Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science* **282**: 935-938.
- Yoshida, M., N. Sone, H. Hirata, Y. Kagawa & N. Ui, (1979) Subunit structure of adenosine triphosphatase. Comparison of the structure in thermophilic bacterium PS3 with those in mitochondria, chloroplasts, and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **254**: 9525-9533.
- Zak, E., B. Norling, R. Maitra, F. Huang, B. Andersson & H.B. Pakrasi, (2001) The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 13443-13448.
- Zamecnik, P.C., M.L. Stephenson & L.I. Hecht, (1958) Intermediate reactions in amino acid incorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **44**: 73-78.
- Zhang, C.-M., J.J. Perona, K. Ryu, C. Francklyn & Y.-M. Hou, (2006a) Distinct kinetic mechanisms of the two classes of aminoacyl-tRNA synthetases. *Journal of molecular biology* **361**: 300-311.

- Zhang, G., R. Lukoszek, B. Mueller-Roeber & Z. Ignatova, (2011) Different sequence signatures in the upstream regions of plant and animal tRNA genes shape distinct modes of regulation. *Nucleic acids research* **39**: 3331-3339.
- Zhang, L., Y. Kato, S. Otters, U.C. Vothknecht & W. Sakamoto, (2012) Essential role of VIPP1 in chloroplast envelope maintenance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 3695-3707.
- Zhang, L. & W. Sakamoto, (2015) Possible function of VIPP1 in maintaining chloroplast membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1847**: 831-837.
- Zhang, S., G. Shen, Z. Li, J.H. Golbeck & D.A. Bryant, (2014) Vipp1 is essential for the biogenesis of photosystem I but not thylakoid membranes in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 15904-15914.
- Zhang, X., G. Dong & S.S. Golden, (2006b) The pseudo - receiver domain of CikA regulates the cyanobacterial circadian input pathway. *Molecular microbiology* **60**: 658-668.
- Zhang, Y., C.S. Mandava, W. Cao, X. Li, D. Zhang, N. Li, Y. Zhang, X. Zhang, Y. Qin & K. Mi, (2015) HflX is a ribosome-splitting factor rescuing stalled ribosomes under stress conditions. *Nature structural & molecular biology*.
- Zhong, J., C. Xiao, W. Gu, G. Du, X. Sun, Q.-Y. He & G. Zhang, (2015) Transfer RNAs mediate the rapid adaptation of *Escherichia coli* to oxidative stress. *PLoS Genet* **11**: e1005302.

8 ARTÍCULOS



Sub-Cellular Localization and Complex Formation by Aminoacyl-tRNA Synthetases in Cyanobacteria: Evidence for Interaction of Membrane-Anchored ValRS with ATP Synthase

Javier Santamaría-Gómez¹, Jesús A. G. Ochoa de Alda², Elvira Olmedo-Verd¹, Roque Bru-Martínez³ and Ignacio Luque^{1*}

¹ Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad de Sevilla, Seville, Spain, ² Facultad de Formación del Profesorado, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain, ³ Department of Agrochemistry and Biochemistry, Faculty of Science, University of Alicante, Alicante, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Wendy Schlachter,
University of New Orleans, USA

Reviewed by:

Conrad Mullineaux,
Queen Mary University of London, UK

Michael Ibba,
Ohio State University, USA
José Manuel García-Fernández,
Universidad de Córdoba, Spain

*Correspondence:

Ignacio Luque
ignacio.luque@ibvf.csic.es

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 26 April 2016

Accepted: 23 May 2016

Published: 06 June 2016

Citation:

Santamaría-Gómez J, Ochoa de Alda JAG, Olmedo-Verd E, Bru-Martínez R and Luque I (2016) Sub-Cellular Localization and Complex Formation by Aminoacyl-tRNA Synthetases in Cyanobacteria: Evidence for Interaction of Membrane-Anchored ValRS with ATP Synthase. *Front. Microbiol.* 7:857. doi: 10.3389/fmicb.2016.00857

tRNAs are charged with cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) and subsequently delivered to the ribosome to be used as substrates for gene translation. Whether aminoacyl-tRNAs are channeled to the ribosome by transit within translational complexes that avoid their diffusion in the cytoplasm is a matter of intense investigation in organisms of the three domains of life. In the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, the valyl-tRNA synthetase (ValRS) is anchored to thylakoid membranes by means of the CAAD domain. We have investigated whether in this organism ValRS could act as a hub for the nucleation of a translational complex by attracting other aaRSs to the membranes. Out of the 20 aaRSs, only ValRS was found to localize in thylakoid membranes whereas the other enzymes occupied the soluble portion of the cytoplasm. To investigate the basis for this asymmetric distribution of aaRSs, a global search for proteins interacting with the 20 aaRSs was conducted. The interaction between ValRS and the FoF1 ATP synthase complex here reported is of utmost interest and suggests a functional link between elements of the gene translation and energy production machineries.

Keywords: aminoacyl-tRNA synthetases, membrane-anchoring, cyanobacteria, FoF1 ATP synthase, thylakoids, CAAD

INTRODUCTION

A hallmark of life is the reclusion of molecules in individual entities named cells with an uneven distribution of components within the internal space. Internal organization of cells is complex and it is optimized for functioning. Components are confined to a particular cell structure or compartment either because such environment is best suited for its function, to make possible their interaction with other components (i.e., substrates, regulators) or to avoid spurious interactions with other molecules (Yeates et al., 2008; Shapiro et al., 2009; Montero Llopis et al., 2010). Compared to eukaryotic cells, bacteria are structurally simple as they lack a nucleus and organelles. Cyanobacteria are unique among bacteria in the sense that they possess an intracytoplasmic system

of membrane saculi named thylakoids, which act as a physical support for large protein complexes involved in energy production by photosynthesis, including photosystems I and II, cytochrome *b₆f* and ATP synthase (Liberton and Pakrasi, 2008). Recent investigations have demonstrated that in some cyanobacteria components of the gene translation machinery, namely aminoacyl-tRNA synthetases, are also anchored to thylakoid membranes (Olmedo-Verd et al., 2011).

Gene translation in the cytoplasm of bacteria occurs at 70S ribosomes through pairing the anticodons of charged tRNAs to complementary codons of mRNAs. Charged tRNAs or aminoacyl-tRNAs are produced by aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs), a family of enzymes that catalyze the ATP-dependent esterification of amino acids to the 3' acceptor end of cognate tRNAs (Ibba and Soll, 2000). Cells generally count with a set of twenty aaRSs, each one specific for its cognate amino acid. According to structural and conservation criteria, aaRSs are partitioned in two classes with distinct phylogenetic origins (Eriani et al., 1990; Ribas de Pouplana and Schimmel, 2001). Once produced, aminoacyl-tRNAs form a complex with GTP-activated elongation factor-Tu that delivers them to the A site of the ribosome (Simonetti et al., 2009).

A striking trait of species of the phylum Cyanobacteria observed in no other living organism is the presence of catalytically-active aaRSs anchored to membranes (Luque et al., 2008; Olmedo-Verd et al., 2011). Membrane anchoring was particularly well demonstrated for the Valyl-tRNA synthetase (ValRS) of *Anabaena* sp. PCC 7120 (hereafter *Anabaena*), which harbors an idiosyncratic domain, termed CAAD, with a putative C-terminal coiled-coil and two transmembrane helices, that mediates its binding to the lipid bilayer (Luque et al., 2008; Olmedo-Verd et al., 2011; Luque and Ochoa de Alda, 2014). This domain was also observed in the ValRS of some other cyanobacterial species. Interestingly, in few other species, CAAD was found inserted either in GluRS, IleRS, or LeuRS (Luque et al., 2008). CAAD is homologous to a family of stand-alone membrane proteins of cyanobacteria and plant chloroplast, named Curt1, or CURT1, respectively (Armbruster et al., 2013; Luque and Ochoa de Alda, 2014). Cyanobacteria and plant chloroplasts share a common phylogenetic origin, they both perform oxygenic photosynthesis and show functional and structural similarities. Thylakoid membranes are distributed in the stroma of chloroplasts or the cytoplasm of cyanobacteria, which are topologically equivalent. In chloroplasts, CURT1 proteins are integral membrane proteins that localize at the edges of thylakoid grana saculi and are responsible for the pronounced curvature of the membrane at this position (Armbruster et al., 2013). Cyanobacteria thylakoids do not pile up forming grana, however, *Arabidopsis* CURT1A was able to partially complement a *curt1* mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, indicating some degree of functional conservation (Armbruster et al., 2013).

CAAD mediates the specific targeting of ValRS to thylakoid membranes in *Anabaena* (Olmedo-Verd et al., 2011). Consistent with the absence of any ValRS paralog in *Anabaena*, tRNA^{Val}-charging activity is confined to the membrane fractions of cell extracts. Artificial removal of CAAD from *Anabaena* ValRS

rendered the enzyme soluble but had little impact on its catalytic parameters, indicating that CAAD's function is mostly structural (Olmedo-Verd et al., 2011). Based on these data, it was proposed that in the other species where ValRS was also observed to contain CAAD, the enzyme would localize in thylakoid membranes. Furthermore, it was assumed that in the species where GluRS, IleRS, or LeuRS contained such domain, these enzymes would share such subcellular localization, but this has not been demonstrated. Conversely, aaRSs lacking CAAD in *Anabaena* and other species were all assumed to be soluble, which for the vast majority of them still awaits empirical demonstration. Worth to investigate is the possibility that despite the absence of an apparent membrane-anchoring domain, some of these aaRSs may be indirectly attached to membranes through interaction with membrane proteins. It has been shown that aaRSs form stable or transient complexes with other proteins in a variety of organism, a phenomenon that appears frequent in eukaryotes and archaea and less common in bacteria, where aaRSs are thought to be dispersed in the cytoplasm (Mirande et al., 1982; Hausmann and Ibba, 2008; Godinic-Mikulcic et al., 2011; Raina et al., 2012; Laporte et al., 2014).

Notwithstanding the recent demonstration of the anchoring of the ValRS to thylakoid membranes in *Anabaena*, the information on the sub-cellular localization of aaRSs in cyanobacterial cells is limited and a global picture of the distribution of the full complement of aaRSs is lacking. This information is fundamental to understand how the initial steps of translation occur in these organisms and whether they are confined to a particular location. The aim of this work was to determine the sub-cellular localization for all aaRSs in *Anabaena* and to investigate the biological basis for such subcellular distribution. As an approach for this latter goal, we undertook the identification of interacting partners for each aaRSs. In this work we present compelling evidence on the interaction of the membrane-anchored ValRS with the FoF1-ATP synthase complex in *Anabaena* and we identify proteins interacting with soluble aaRSs in this organism.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and Growth Conditions

Anabaena sp. PCC 7120 and derivative strains were grown under standard growth conditions [30°C, continuous illumination (75 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and bubbled with a mixture of CO₂ and air (1% v/v) in BG11 medium (Rippka, 1988) supplemented with 10 mM NaHCO₃]. For the preparation of solid media Difco agar was added at a final concentration of 1% (w/v). When required, antibiotics were used at the following concentrations: neomycin, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for liquid media and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for solid media; streptomycin 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for liquid media and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for solid media; spectinomycin 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for liquid media and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for solid media. In experiments where heterocysts were induced to differentiate, cells from bubbled cultures in BG11 medium were filtered, washed twice with BG11₀ medium (similar to BG11 but lacking NaNO₃), inoculated in BG11₀ medium supplemented with 10 mM NaHCO₃, and cultured for further 24 h at 30°C

under continuous illumination. When indicated, cultures were supplemented with L-methionine sulfoximine (MSX) at a final concentration 2.5 μ M.

Escherichia coli was cultured in LB medium supplemented with antibiotics at standard concentrations when necessary (Ausubel et al., 2010). Strain DH5 α was used for regular cloning and strain C41(DE3) was used for the expression of *Anabaena* ValRS::His and ValRS Δ^C ::His proteins under the control of the T7 promoter. Expression of the T7 RNA polymerase in C41(DE3) cells was induced by addition of IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) at a final concentration of 0.4 mM.

Cell Fractionation

Cyanobacterial cell fractionation and membrane preparation was performed following a procedure based on that described by Sobotka et al. (2008), with some modifications (Olmedo-Verd et al., 2011). Cells from 600 to 700 ml cultures of cyanobacteria were harvested by centrifugation, washed with 50 mM Tris-HCl buffer [pH 7.5] and resuspended in buffer T (20 mM HEPES-NaOH [pH 7.5], 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂ and 20% glycerol) at a ratio of 5 ml of buffer T per gram of cell pellet (wet weight). Cells were disrupted in a French press at 9000 psi in the presence of 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) and Complete™ EDTA free, (Sigma) protease inhibitor cocktail. The cell extracts were centrifuged at 32,000 \times g for 10 min at 4°C to eliminate unbroken cells and cell debris. The supernatant (referred to as the “cell extract”) was ultracentrifuged at 100,000 \times g for 1 h at 4°C. To avoid contamination with the membrane fraction only the top portion (about 75% of the total volume) of the supernatant containing the soluble fraction was saved, while the bottom portion in direct contact with the pellet containing the membranes was discarded. The pellet containing the membranes was washed with buffer T and resuspended in the same buffer supplemented with 1% n-dodecyl- β -D-maltoside. In experiments where membrane purity was paramount, pellets were resuspended in buffer T and ultracentrifuged a second time at 100,000 \times g for 1 h at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in the same buffer supplemented with 1% n-dodecyl- β -D-maltoside. The chlorophyll concentration in cyanobacterial cultures or cell fractions were determined as previously described (Mackinney, 1941), while the protein content was determined by the modified Lowry procedure (Markwell et al., 1978).

Fractionation of IPTG-induced *E. coli* C41(DE3) cells was carried out by resuspension of cells in buffer A (0.05 M phosphate buffer [pH 8], 0.15 M NaCl, and 10% glycerol) and disruption in the French press at 12,000 psi in the presence of 1 mM PMSF. Extracts were subjected to a first centrifugation at 21,000 \times g and the supernatant to a second centrifugation at 100,000 \times g. The supernatant from the second centrifugation contained the soluble fraction. The pellet corresponding to the membrane fraction was washed extensively with buffer A and resuspended in buffer A supplemented with 1% n-dodecyl- β -D-maltoside.

The plasmid and strain construction is described in Table S5. The oligonucleotides used are listed in Table S6.

Colorless-Native Page (CN-PAGE)

Anabaena cells were cultured in BG11-Cu²⁺ (BG11 medium omitting CuCl₂) under standard laboratory conditions till they reached a chlorophyll concentration of 4–5 μ g/ml. At this point, CuSO₄ was added at a final concentration of 1.5 μ M to induce the expression of the *petE* promoter and cells were further cultured under the same conditions for 24 h.

Cells from 700 ml cultures were harvested by filtration washed with thylakoid buffer (25 mM MES-NaOH pH 6.5, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 20% glycerol) and resuspended in the same buffer at a ratio of 5 ml of buffer per gram of cells. Cells were disrupted after the addition of protease inhibitors (Complete™ EDTA free, Sigma) by three passages through a French press at 9000 p.s.i. and extracts were fractionated according to Kopečna et al. (2012). The chlorophyll content of the membrane suspension was measured, digitonin was added at a ratio of 10 grams per gram of chlorophyll, and incubated at 4°C for 30 min.

Samples containing 5 μ g of chlorophyll were first resolved in a 3–13% polyacrylamide gel containing 0.005% digitonin (Krause and Seelert, 2008). The gel was cut into portions corresponding to each lane incubated for 1 h in denaturing solution containing 2% SDS, 66 mM Na₂CO₃, and 0.67% 2-mercaptoethanol. Each gel piece was placed on a denaturing (8–20%) polyacrylamide gel and subjected to SDS-PAGE. Proteins were visualized by gel staining with Coomassie blue.

In vivo Cross-Linking and Protein Purification

Anabaena was cultured in BG11 or BG11-Cu²⁺ medium under standard conditions to a chlorophyll concentration of 4–5 μ g/ml. In those cases where induction of the *petE* promoter was needed CuSO₄ was added to a final concentration of 1.5 μ M and cells were further cultured for 24 h. Cross-linking was performed as described (Staron et al., 2011). Briefly, a solution containing 4% formaldehyde in PBS buffer (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) was added to cultures so that the final concentration of formaldehyde was 0.5% and were incubated under standard culture conditions for 20 min at room temperature. Cells from 80 ml cultures were harvested by centrifugation at 4500 \times g for 5 min at 4°C, washed with 100 mM Tris-HCl buffer pH 8 and resuspended in the same buffer at a ratio of 2 ml of buffer per gram of the cell pellet. Protease inhibitor (Complete™ EDTA free, Sigma) was added and cells were disrupted by 10 passages through a French press at 18000 psi. Extracts were fractionated by centrifugation at 32000 \times g for 15 min at 4°C. The pellet containing unbroken cells and cell debris was discarded and the supernatant was ultracentrifuged at 100,000 \times g for 1 h at 4°C. The supernatant corresponding to the soluble fraction was carefully transferred to new tubes and the pellets corresponding to the membrane fraction was washed three times with 100 mM Tris-HCl buffer pH 8. Pellets were resuspended by addition of 500 μ l of lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM, Tris-HCl pH 8, 10% glycerol) and incubation at 4°C for 30 min. Purifications were performed using the μ MACS™ Epitope Tag Protein Isolation kit (Miltenyi Biotec). Samples containing 7 mg of total protein

were incubated with the corresponding magnetic beads-coupled antibody (anti-tag MicroBeads, Miltenyi) at a ratio of 50 μl of antibody per ml and mixtures were incubated for 1 h at 4°C with gentle shaking. Immunoprecipitations were performed following the instructions provided by the antibody provider. Crosslinking methylene bridges were removed at elution, by incubation for 5 min in a modified SDS-sample buffer (50 mM Tris HCl pH 6.8, 50 mM DTT, 1% SDS, 1 mM EDTA, 0.005% bromophenol blue, 10% glycerol) pre-heated at 95°C. Eluted fractions were resolved by SDS-PAGE in 8–15% polyacrylamide gels.

Enzymatic Assays

Aminoacylation assays were performed as described (Francklyn et al., 2008). Reactions contained 100 mM HEPES [pH 7.2], 20 mM KCl, 30 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 0.1 mg ml^{-1} BSA, 0.5 mM DTT, 20 μM [^{14}C]-L-Val (250 Ci mol^{-1}), 10 μM tRNA and 5–15 nM enzyme. Reactions were incubated at 30°C and stopped on filters soaked with 5% trichloroacetic acid, washed with 5% trichloroacetic acid and the radioactivity retained was counted by scintillation.

Cellular ATP Content Determination

ATP measurements were carried out using a commercial kit (ATP Biomass Kit HS, BioThema) based on luciferase activity following the instructions of the manufacturer. Briefly, 0.1 ng of chlorophyll of a cyanobacterial culture growing in standard conditions (around 25 μl) or incubated for 4 h in the presence of 2.5 μM MSX (L-methionine sulfoximine) was mixed with 50 μl of Extractant B/S and 400 μl of ATP Reagent HS. Light emission was measured in a scintillation counter (LS 6000, Beckman).

Microscopy

Anabaena filaments on solid medium were analyzed by confocal microscopy using a Leica HCX PLAN-APO 63X 1.4 NA oil immersion objective attached to a Leica TCS SP2 confocal laser-scanning microscope. GFP was excited at 488 nm using an argon ion laser. Fluorescent emission was monitored by collection across windows of 500–540 nm (GFP imaging) and 630–700 nm (cyanobacterial autofluorescence).

Bioinformatics

Cyanobacterial species tree was inferred from concatenated small and large rRNA sequences (Ochoa de Alda et al., 2014). Data set selection, retrieval, concatenation, BMGE trimming (default, PAM100 matrix) and removal of constant sites were performed before bayesian phylogenetic reconstruction. GTR+4 Γ +CAT (the evolutionary model that best fits dataset) was selected after carrying out a posterior predictive analysis of different alternatives using the pprer programme implemented in Phylobayes (Lartillot et al., 2009). Phylogenetic reconstruction was achieved using a parallelized version of phylobayes, MPI phylobayes (Lartillot et al., 2013), run at Cipres Gateway High Performance Computing Clusters (Miller et al., 2010). Convergence of two chains was checked with the bpcomp programme, whereby convergence was reached if the maxdiff value of the two chains was <0.1.

Protein Identification by MS

Protein bands were manually excised from Coomassie-stained gels and subjected to in-gel trypsin digestion (Shevchenko et al., 1996) in a Progest automatic in-gel protein digester (Genomic Solutions, Cambridgeshire, UK) according to the manufacturer's recommendations for Coomassie-stained samples. To remove dye and SDS impurities, gel plugs were extensively washed with 25 mM ammonium bicarbonate, in-gel reduced with 60 mM dithiothreitol, and S-alkylated with excess iodoacetamide followed by digestion with modified porcine trypsin (Promega, Madison WI) (1:100 wt/wt) at 37°C for 6 h. Peptides were subjected to subsequent extractions in ammonium bicarbonate, 70% acetonitrile, and 1% formic acid, dried down by a Speed-Vac centrifugation and resuspended in 10 μL of 0.1% formic acid.

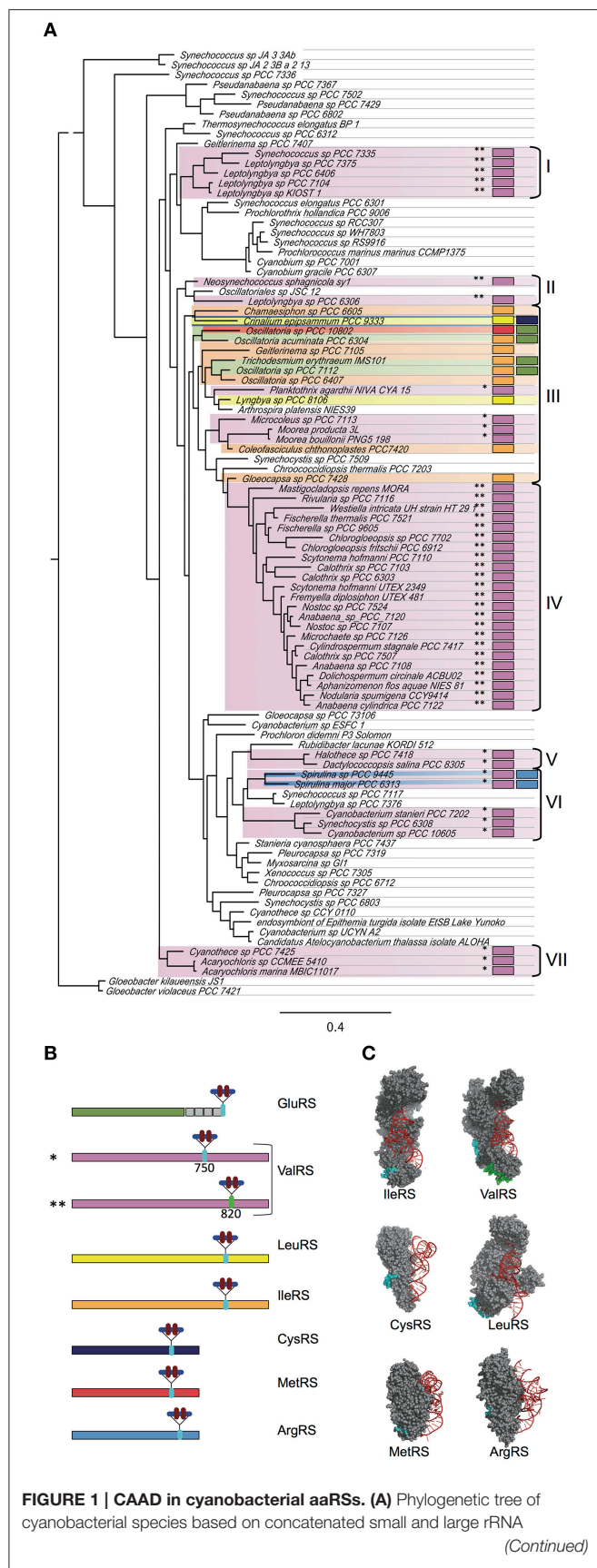
An Agilent XCT plus ion trap mass spectrometer with a ChipCube interface fed by an Agilent 1100 series nanopump HPLC system was used for MS and MS/MS data acquisition. Samples were concentrated, desalted, and resolved using the ProtID-Chip-150 (II) (Agilent) as described (Martinez-Esteso et al., 2011). MS spectra were scanned at 26,000 m/z per second and MS/MS spectra at 8100 m/z per second in the range 300–2200 m/z. The four most intense precursor ions in MS scans were selected for MS/MS and then passed to an active exclusion list released after 1 min.

Each MS/MS spectra data set (ca. 1200 spectra/run) was processed to determine monoisotopic masses and charge states, to merge MS/MS spectra with the same precursor ($\Delta m/z < 1.4$ Da and chromatographic $\Delta t < 15$ s) and to select high quality spectra with the Extraction tool of SpectrumMill Proteomics Workbench (Agilent). The reduced data set was searched against the Swissprot forward and reversed protein database without taxonomical restrictions in the identity mode with the MS/MS Search tool of SpectrumMill Proteomics Workbench using the following parameters: trypsin, up to 2 missed cleavages, fixed modification carbamidomethylation of cysteine, variable modification oxidation of methionine, and a mass tolerance of 2.5 Da for the precursor and 0.7 Da for product ions. Peptide hits were validated first in the peptide mode and then in the protein mode according to the score settings recommended by the manufacturer.

RESULTS

Identification of Novel aaRSs Containing CAAD

Previous work revealed 14 cyanobacterial species with CAAD inserted in either GluRS, ValRS, IleRS, or LeuRS (Olmedo-Verd et al., 2011). Analysis of newly sequenced genomes evidenced that these CAAD-containing aaRSs (hereafter aaRS^C) are widespread in the cyanobacterial radiation. Very interestingly, analysis of new genome sequences also revealed the presence of CAAD in other class I aaRSs, including ArgRS, MetRS and CysRS. Among the 279 sequenced cyanobacteria, 102 contained at least one aaRS^C. ValRS^C, the most widespread, was found in 79 species whereas IleRS^C was present in 11 species, GluRS^C in 5, LeuRS^C in 2, ArgRS^C in 2, CysRS^C in 1 and MetRS^C in 1 (Figure 1A, Tables S1–S3). The absence of paralogs

**FIGURE 1 | Continued**

sequences. Representative species of distinct phylogenetic groups were chosen for the construction of the tree. The existence of aaRSs containing CAAD in particular species is indicated with colored boxes following the same color code as in (B). One or two asterisks indicate the insertion of CAAD at positions 750 or 820 in ValRS, respectively. Clades containing species with aaRSs^C are indicated by brackets and roman numbers. (B) Diagram showing the position of the insertion of CAAD in distinct aaRSs. (C) Representation of bacterial aaRSs based on structures in the Protein Data Bank (PDB codes 1FFY, HVS, 2BYT, 1LI5, 2CT8, and 1F7U). The amino acids corresponding to the insertion point of CAAD in cyanobacterial aaRSs are highlighted in cyan. For the ValRS, the insertion points corresponding to positions 750 and 820 are indicated in cyan and green respectively. The diagrams for ValRS, IleRS, and LeuRS have been published elsewhere (Olmedo-Verd et al., 2011) and are shown here for the sake of comparison.

in these species indicated that such enzymes are active for tRNA aminoacylation. Eight species contained two aaRS^C in four different combinations (LeuRS^C+CysRS^C, ValRS^C+ArgRS^C, GluRS^C+MetRS^C, GluRS^C+IleRS^C). The emerging picture was quite intriguing as two thirds of species contained no aaRSs^C and one third possessed one or two aaRSs^C (Figure 1A). Besides, no organism outside the cyanobacterial phylum was found to contain aaRSs^C.

In the new aaRSs^C detected in this study (ArgRS^C, MetRS^C, and CysRS^C), CAAD is inserted at internal positions C-terminal to the catalytic domain (Figure 1B), which in the 3-D structure correspond to residues of the opposite surface to that interacting with tRNA (Figure 1C), similar to what is observed for ValRS^C, LeuRS^C, and IleRS^C.

In the particular case of ValRS, CAAD was previously found at two alternative insertion points (positions 750 and 820, approximately) in different species, suggesting that each insertion was the result of independent evolutionary events (Olmedo-Verd et al., 2011). In the new species here detected to contain ValRS^C, CAAD is inserted at either of these positions and species with CAAD at the same position tend to cluster in the phylogenetic species tree (Figure 1A, clusters I to VII), supporting that in clustered species ValRS^C is the result of a common insertion event. Phylogenetic analyses of CAAD lend support to this view (Figure S1).

CAAD Functions as a Membrane-Targeting Domain in Cyanobacteria and in Heterologous Systems

In order to check whether similar to ValRS^C in *Anabaena*, other aaRSs^C from different species also localize at the thylakoid membrane, genes encoding representatives of each of them were PCR amplified using genomic DNA from the corresponding species, fused to the ORF of the green fluorescent protein (GFP), cloned in a shuttle vector downstream of the *petE* inducible promoter and introduced in *Anabaena* by conjugation. Except for the construction expressing the GFP fusion of LeuRS^C from *Lyngbya* sp. PCC 8106, all other constructions showed a strong toxicity in *Anabaena* and ex-conjugants could not be obtained despite multiple attempts, which is in line with previous findings about the barriers to horizontal transfer of genes involved in

translation due to toxicity of their gene products (Sorek et al., 2007). For the GFP-LeuRS^C fusion, fluorescence of GFP was monitored by confocal microscopy and it was observed to co-localize with the red fluorescence of the photosynthetic pigments, indicating a specific localization in the thylakoid membranes (Figure 2A, left; compare with controls of soluble and plasma membrane proteins in center and right panels). This reproduces the reported localization of the *Anabaena* ValRS^C-GFP fusion and it is consistent with the observed confinement of tRNA^{Leu} charging activity in membrane fractions of *Lyngbya* cell extracts (Olmedo-Verd et al., 2011).

These observations indicated that similar to the well-characterized ValRS^C of *Anabaena*, other CAAD-containing aaRSs from distinct species would also localize in thylakoid membranes and in turn, that CAAD would function as a membrane-targeting domain in different cyanobacterial species. This raised the question of whether CAAD could mediate protein targeting to membranes independently of the host. To test this, the *Anabaena* ValRS^C ORF was fused to a His-tag (His-ValRS^C), expressed in *E. coli* C41(DE3) and its presence was analyzed in sub-cellular fractions. As observed in Figure 2B, His-ValRS^C mostly localized in the membrane fraction of cells induced with IPTG. Consistent with this, membrane fractions of these cells exhibited tRNA^{Val} aminoacylation activity, whereas membrane fractions of the recipient *E. coli* strain carrying the empty vector or a plasmid expressing His-ValRS^{ΔC} (where CAAD was deleted) were virtually devoid of activity (Figure 2C). ValRS^{ΔC} was actually found in the soluble fraction of *E. coli* cells (Figure 2B). These results evidenced that CAAD can function as a membrane-targeting domain also in organisms where it does not exist, suggesting that the capacity for membrane targeting is inherent to this domain. It is worth mentioning that *E. coli* does not possess thylakoid membranes, so in this organism CAAD mediates protein targeting to the plasma membrane.

Subcellular Localization of the 20 aaRSs in *Anabaena*

The distribution of aaRSs in cyanobacterial cells was addressed. A possibility to be tested was whether aaRSs not containing CAAD could bind to membranes despite the absence of an apparent membrane-anchoring domain. We hypothesized that, if translation complexes existed, they were likely to accrue around membrane ValRS^C, as a result of its restricted mobility. To investigate this, *Anabaena* strains were engineered to express each aaRSs fused to GFP from the *petE* inducible promoter and the subcellular localization of the fusion proteins was monitored by confocal fluorescence microscopy. *Anabaena* contains duplicated ThrRSs, named T1 and T2, (Napolitano et al., 2012; Rubio et al., 2015) and similar to many other bacteria, it lacks a GlnRS, Gln-tRNA^{Gln} being synthesized through the indirect pathway (Schon et al., 1986; Luque et al., 2008). For hetero-oligomeric aaRSs, namely GlyRS and PheRS, only one construct fusing the α subunit to GFP was made. Thus, 20 different constructs were introduced in *Anabaena*. Consistently with published data, the GFP-ValRS^C fusion showed a sub-cellular distribution that matched

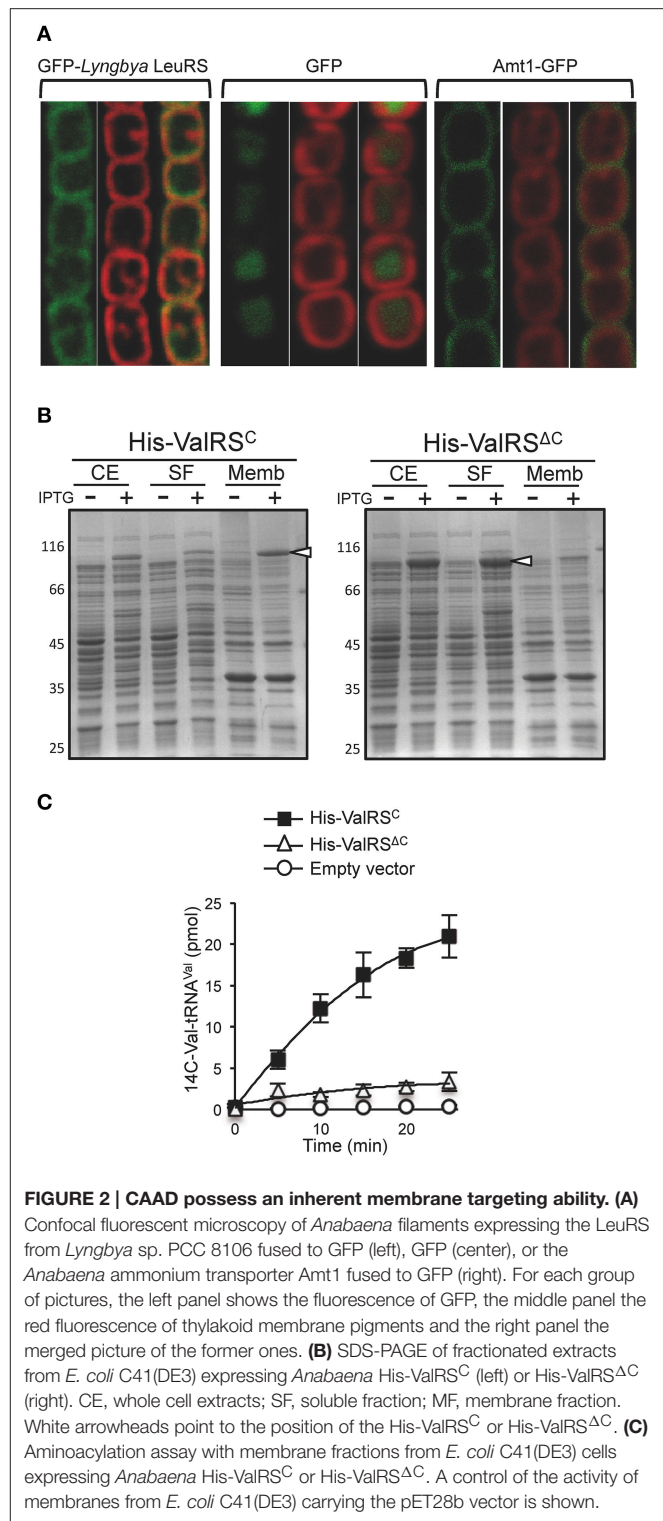


FIGURE 2 | CAAD possess an inherent membrane targeting ability. (A)

Confocal fluorescent microscopy of *Anabaena* filaments expressing the LeuRS from *Lyngbya* sp. PCC 8106 fused to GFP (left), GFP (center), or the *Anabaena* ammonium transporter Amt1 fused to GFP (right). For each group of pictures, the left panel shows the fluorescence of GFP, the middle panel the red fluorescence of thylakoid membrane pigments and the right panel the merged picture of the former ones. **(B)** SDS-PAGE of fractionated extracts from *E. coli* C41(DE3) expressing *Anabaena* His-ValRS^C (left) or His-ValRS^{ΔC} (right). CE, whole cell extracts; SF, soluble fraction; MF, membrane fraction. White arrowheads point to the position of the His-ValRS^C or His-ValRS^{ΔC}. **(C)** Aminoacylation assay with membrane fractions from *E. coli* C41(DE3) cells expressing *Anabaena* His-ValRS^C or His-ValRS^{ΔC}. A control of the activity of membranes from *E. coli* C41(DE3) carrying the pET28b vector is shown.

the autofluorescence of photosynthetic pigments, used here as an indicator of the position of thylakoid membranes (Figure 3, top panels). By contrast, the fluorescence of all other GFP fusions was detected in the central part of the cytoplasm, with a pattern complementary to that of thylakoid

membranes (**Figure 3**). This signal was similar to that of the soluble GFP protein (**Figure 2A**) and indicates a sub-cellular distribution of these aaRSs in the soluble portion of the cytoplasm.

In the absence of combined nitrogen, *Anabaena* filaments differentiate specialized cells named heterocysts, which are mostly devoted to nitrogen fixation and show a distinct ultrastructure and morphology. ValRS^C was shown to undergo a re-localization along the differentiation process to concentrate at the poles of mature heterocysts (Olmedo-Verd et al., 2011) (see also Figure S2, top panels). The behavior of the 20 GFP-aaRS fusions during differentiation was analyzed here. GFP-aaRSs not containing CAAD did not show any sign of re-localization, so that in mature heterocysts they showed a subcellular distribution similar to that in vegetative cells (Figure S2).

Complex Formation by Membrane-Bound and Soluble aaRSs in *Anabaena*

The asymmetric distribution of aaRSs in *Anabaena*, with 19 soluble and one membrane-bound aaRS was intriguing. We hypothesized that the membrane-bound aaRS could have acquired novel functionality, perhaps not related to its canonical aminoacylation function, that emanates from this new localization. This functionality could be exerted through interaction with other proteins, whose identity could shed light on this issue. On the other hand, soluble aaRSs could also interact with other proteins. To get an insight on this, a global analysis was conducted in search for proteins that interacted with any of the 20 aaRSs in *Anabaena*. The experimental approach consisted in the *in vivo* crosslinking of *Anabaena* cells expressing each GFP-aaRS fusion, followed by cell disruption and purification with anti-GFP antibodies coupled to magnetic beads. For the strains expressing the soluble GFP-aaRSs fusions, proteins were purified from the soluble fraction of cell extracts whereas for the strain expressing ValRS^C-GFP, purifications were performed from whole cell extracts and membrane fractions (see below). Proteins from each purification were resolved by SDS-PAGE after crosslinking reversal (see Materials and Methods).

For each of the soluble aaRSs, a major band coincident with the expected MW of the respective GFP fusion was observed in SDS-PAGE gels (**Figure 4**, white arrowheads) and both GFP and the corresponding aaRS were identified in such bands by mass spectrometry (MS). Differential bands (i.e., those that were absent from control lanes containing proteins purified from *Anabaena* wild-type cells or a strain expressing GFP) that putatively corresponded to proteins interacting with aaRSs, were selected for MS identification. Quite surprisingly, most of the 141 bands subjected to MS identification corresponded to putative proteolytic products of the corresponding aaRS (despite the rapid manipulation of samples at low temperature and the regular addition of a cocktail of protease inhibitors to all solutions). However, some proteins that corresponded to putative aaRS interactants were identified and are listed in Table S4. It is crucial to mention that GFP- α -GlyRS and GFP- α -PheRS co-purified with their respective β subunits (**Figure 4**, lanes 5 and

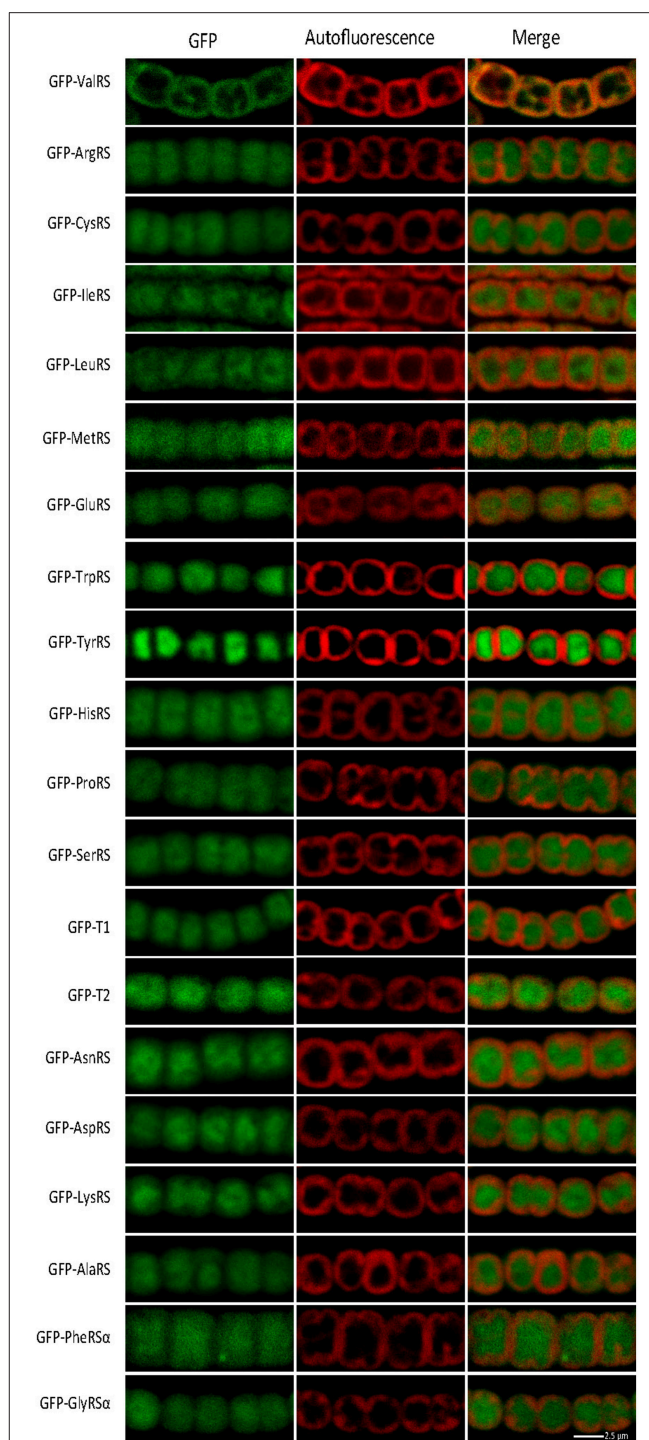


FIGURE 3 | Confocal fluorescent microscopy of *Anabaena* filaments expressing the indicated fusion protein. Left panels show the green fluorescence of GFP; central panels, the red fluorescence of photosynthetic pigments and right panels the merged picture of the former ones.

22, black arrowheads), which validated this approach at least for the co-purification of proteins forming stable complexes.

In the particular case of ValRS^C-GFP, numerous bands corresponding to putative proteolytic products (labeled with

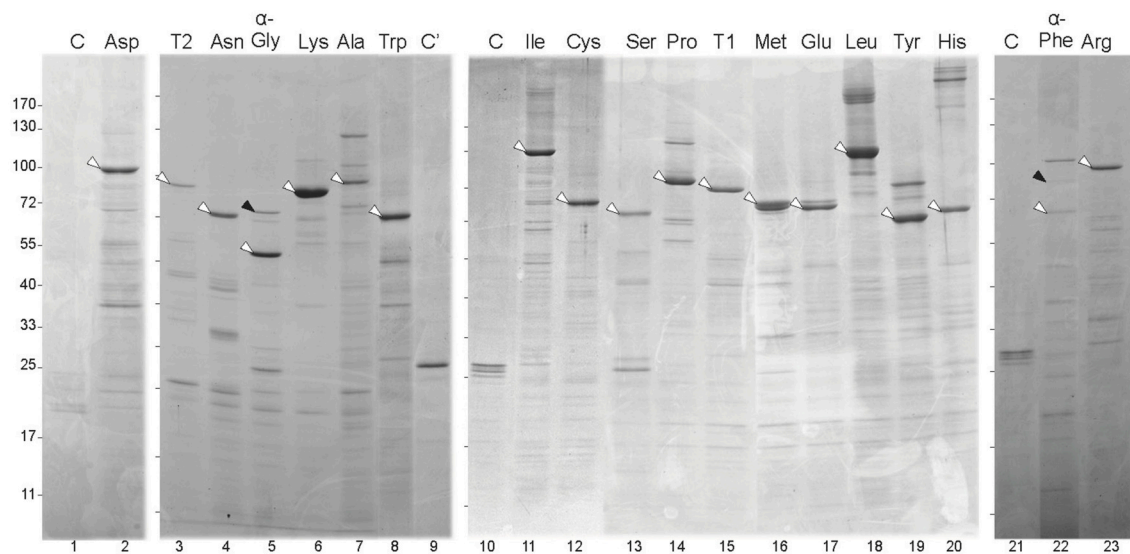


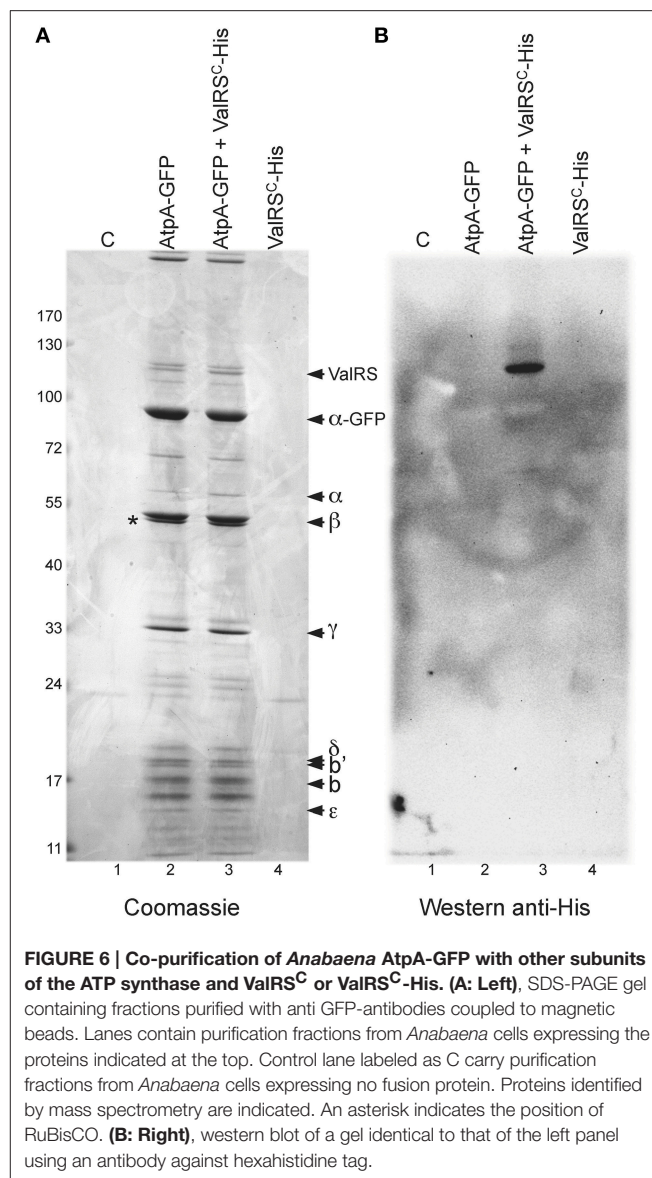
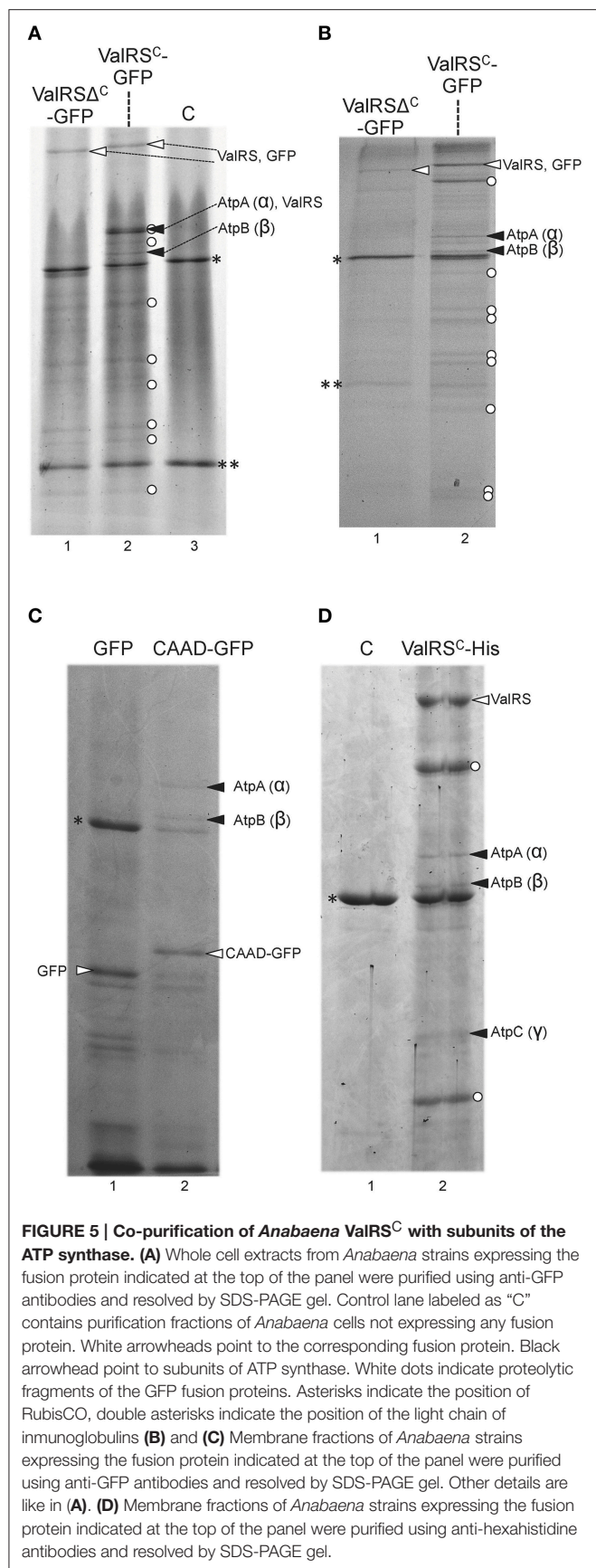
FIGURE 4 | Purification of GFP-aaRS fusion proteins from *Anabaena* cells. Panels correspond to SDS-PAGE gels. Each lane contains fractions from the purification of a GFP-aaRS fusion protein (indicated at the top by the cognate amino acid of the aaRS) from *Anabaena* cells expressing it. Control lanes labeled as C or C' carry purification fractions of *Anabaena* cells or *Anabaena* cells expressing GFP, respectively. White arrowheads point to the corresponding fusion protein. Black arrowheads point at the beta subunit of GlyRS (lane 5) and PheRS (lane 22). Marks at the left side of each panel indicate the position of the bands of the PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

white dots in **Figure 5**) were also observed in the electrophoreses, despite measures mentioned above were taken to avoid proteolysis. ValRS^C-GFP was readily detected in purifications from whole cell extracts (**Figure 5A**, white arrowheads). Interestingly, specific bands (**Figure 5A**, black arrowheads), observed in the lane containing ValRS^C-GFP that were absent in lanes containing fractions from control strains expressing ValRS^{ΔC}-GFP or no fusion protein (**Figure 5A**, lanes 1 and 3, respectively) were identified as subunits α (AtpA) and β (AtpB) of the FoF1-ATP synthase. Further purifications were conducted using membrane fractions of the above-mentioned strains and again, subunits α (AtpA), β (AtpB) and, in some experiments, subunit γ (AtpC) of the ATP synthase complex were detected to co-purify specifically with ValRS^C-GFP (**Figure 5B**, black arrowheads). Importantly, subunits of the ATP synthase did not co-purify with GFP-ValRS^{ΔC} from either whole-cell extracts (**Figure 5A**, lane 1) or membrane fractions (**Figure 5B**, lane 1), suggesting that CAAD would be directly involved in the interaction. To test this, membrane fractions from *Anabaena* strains engineered to express GFP-CAAD or GFP were used for purification experiments similar to those described above. Two bands identified as AtpA (α) and AtpB (β) were detected in the lane corresponding to the strain expressing GFP-CAAD (**Figure 5C**, lane 2) but not in the control lane corresponding to that expressing GFP (**Figure 5C**, lane 1), indicating that CAAD is directly involved in the interaction with these proteins.

To rule out artifacts derived from the use of the GFP tag in the experiments above, membrane fractions of a strain engineered to express ValRS^C fused to a C-terminal His tag were used for purification with anti-His tag antibodies coupled

to magnetic beads after *in vivo* cross-linking. Proteins that co-purified specifically with ValRS^C-His were identified as AtpA (α), AtpB (β), and AtpC (γ) (**Figure 5D**, lane 2).

Further evidence for this interaction was sought by reciprocal co-purification experiments. The *atpA* ORF, encoding the α subunit of the ATP synthase, was fused to the ORF encoding GFP and the resulting construct was introduced in wild-type *Anabaena* and in the strain expressing ValRS^C-His. Cultures of these strains and control strains were subjected to *in vivo* crosslinking and purification with anti-GFP antibodies coupled to magnetic beads. Purified fractions were resolved by SDS-PAGE after crosslinking reversal (**Figure 6A**). A number of bands were observed in lanes corresponding to the strains expressing AtpA-GFP in a wild-type background (lane 2) or a background expressing ValRS^C-His (lane 3), but not in lanes 1 and 4 corresponding to control strains not expressing AtpA-GFP (lane 1, wild-type background; lane 4, ValRS^C-His background). AtpA-GFP was identified as the most intense band in lanes 2 and 3 by size and MS. Other prominent bands contained subunits β , γ , δ , b , b' , and ϵ of the ATP synthase. Importantly, the intensity of the bands was consistent with the subunit stoichiometry of ATP synthase, indicating that AtpA-GFP had successfully integrated in the FoF1 complex. The presence of a minor band matching the size and identified by MS as the endogenous α subunit (AtpA), indicated that some of the complexes contained both AtpA-GFP and AtpA subunits. Crucially, a specific band with a molecular weight of ca. 110 kDa only present in lanes 2 and 3 was identified by MS as ValRS^C. A band of similar size was revealed by western blot with anti-His antibodies (**Figure 6B**, lane 3), corroborating the presence of ValRS^C-His at this position.



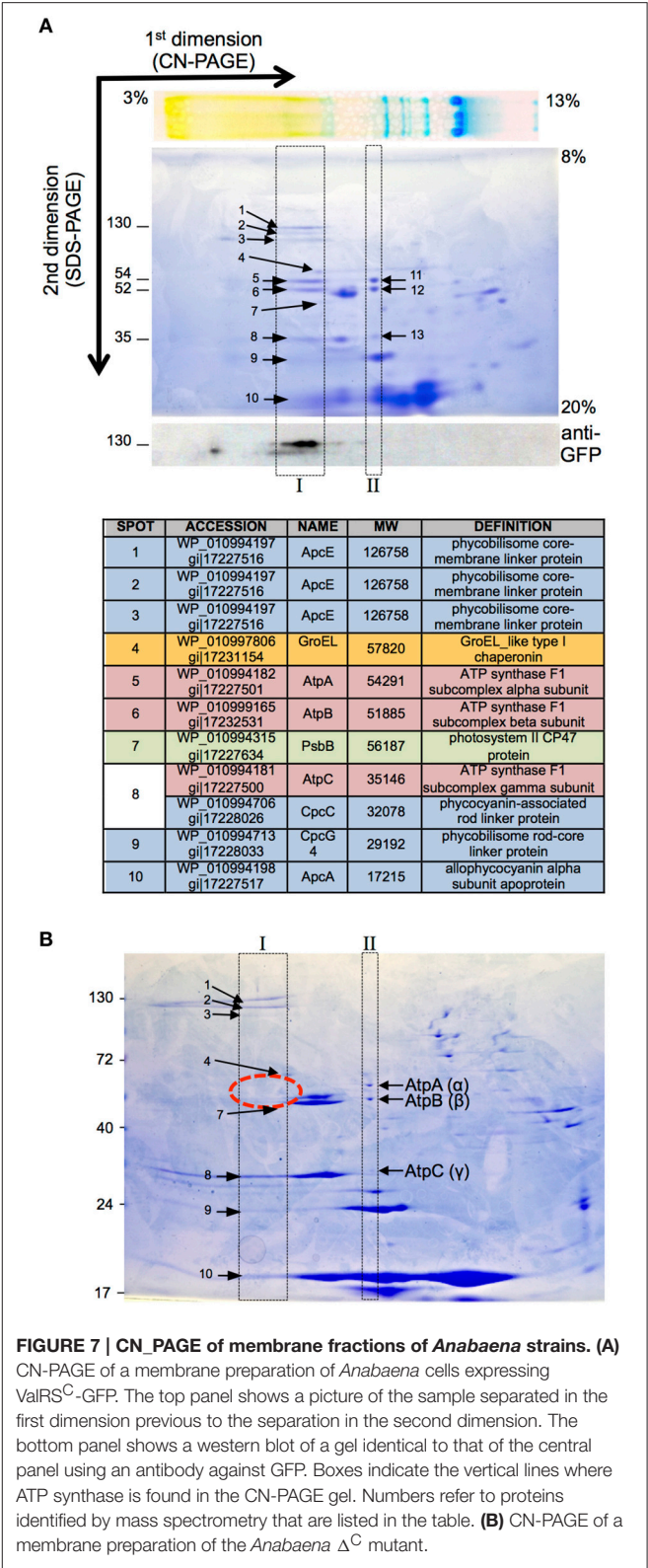
Results above strongly indicate that ValRS^C interacts with the ATP synthase complex in the thylakoid membranes of *Anabaena*. A technique extensively used for the identification and analysis of membrane protein complexes, including photosynthetic and respiratory complexes, is 2D-native electrophoresis that includes blue-native and colorless-native electrophoresis. In these gels, protein complexes are resolved in the first dimension in native conditions (in the presence of a mild detergent) and after denaturation, the components of each complex are separated in the second dimension by SDS-PAGE. Thus, in 2D-native gels the components of a particular protein complex distribute within a vertical line. To analyze complex formation by ValRS^C in *Anabaena*, colorless-native (CN-native) electrophoresis was chosen for its better preservation of labile complexes (Wittig et al., 2007). To facilitate detection, membrane preparations of the *Anabaena* strain expressing ValRS^C-GFP were utilized, so that its position in the gels could be ascertained by western

blot with anti-GFP antibodies. ValRS^C-GFP, was detected in the first dimension in the high-molecular-weight zone of the gel, suggesting its integration in a large complex. In the second dimension, it occupied a position consistent with its expected molecular weight (130 kDa; **Figure 7A**, bottom panel). Proteins in the same vertical line as ValRS^C-GFP (**Figure 7A**, box I) were identified by MS and are listed in **Figure 7A**. Very importantly, AtpA, AtpB, and AtpC were among them (**Figure 7A** spots 5, 6 and 8). AtpA, AtpB, and AtpC were also identified in a vertical line elsewhere in the gel, at a position that corresponded to a complex of a smaller size (**Figure 7A**, spots 11, 12, and 13 in box II). These observations suggested that part of the ATP synthase complex would be shifted in the gel to a position of a higher molecular weight by interaction with ValRS^C-GFP. When CN-native gels were made with membrane preparations of a mutant named Δ^C, where CAAD was deleted from ValRS (see below), ATP synthase subunits were only observed at the low molecular weight complex (**Figure 7B**, box II), indicating that their presence in the high molecular weight complex (box I) was dependent on the presence of ValRS^C in the membranes.

The subcellular localization of the FoF1-ATP synthase in *Anabaena* was examined by monitoring the fluorescence of the AtpA-GFP fusion. As observed in **Figure 8**, the green fluorescence of AtpA-GFP in vegetative cells co-localized with the red auto-fluorescence of photosynthetic pigments indicating localization of the ATP synthase complex in the thylakoid membranes, which is similar to the distribution of ValRS^C-GFP. In mature heterocysts, where ValRS^C concentrates at the cell poles, the distribution of AtpA-GFP overlapped but was not totally coincident with that of GFP-ValRS^C, showing also some enrichment at the cell poles.

Functional Consequences of the ValRS-ATP Synthase Interaction

Given the difficulty to reconstitute the interaction between ValRS and ATP synthase *in vitro*, we analyzed the impact of the interaction on the activity of ValRS by measuring aminoacylation activity in whole cell extracts of the wild type strain and the *Anabaena* Δ^C mutant, where the interaction between ValRS and ATP synthase was not expected to occur. The only genetic modification of this mutant was the replacement of the *valS* gene by a mutant allele encoding the ValRS^{ΔC} protein, not altering the *valS* promoter or any other sequence in the genome. It is worth to note that at difference with the WT strain, the tRNA^{Val} aminoacylation activity was found in the soluble fraction in this mutant (**Figure S3A**). Whole cell extracts of the WT strain and the Δ^C mutant showed similar tRNA^{Val} aminoacylation activity [0.115 ± 0.009 and 0.128 ± 0.010 pmol (¹⁴C)-Val-tRNA^{Val} min⁻¹ · μg protein⁻¹, respectively (numbers are the mean aminoacylation activity of three independent cultures±standard deviation)] suggesting that the interaction with ATP synthase does not have a strong impact on the activity of the aaRS. The alternative hypothesis that the interaction would have an impact on the activity of the FoF1 complex was considered. To test this, the ATP content of cells was measured as a proxy of the activity of the FoF1 complex. Wild type and Δ^C cells had similar ATP



content [$2.01 \text{ mM} \pm 0.12$ and $1.87 \text{ mM} \pm 0.33$, respectively (numbers are the mean ATP concentration of three independent cultures±standard deviation)]. Since it was previously observed

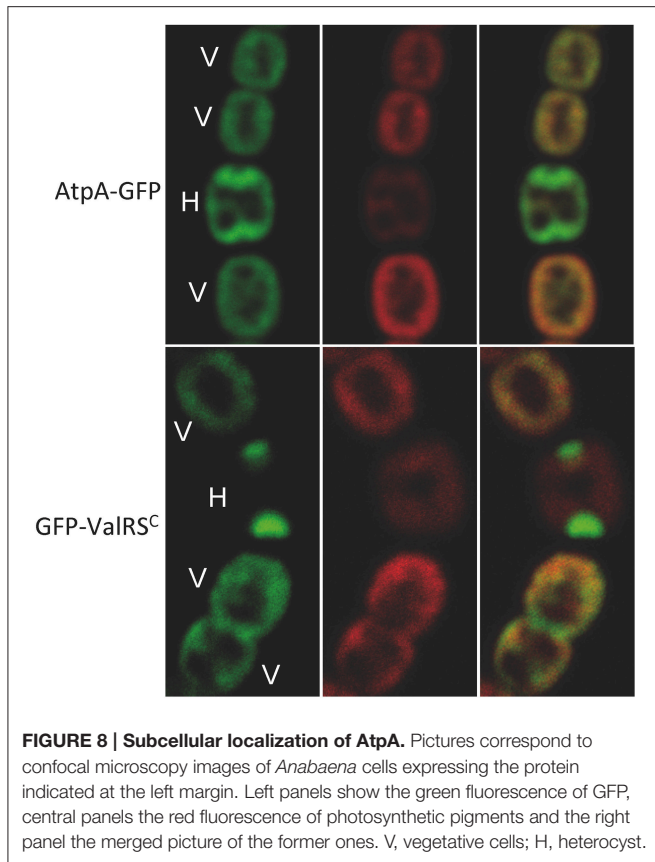


FIGURE 8 | Subcellular localization of AtpA. Pictures correspond to confocal microscopy images of *Anabaena* cells expressing the protein indicated at the left margin. Left panels show the green fluorescence of GFP, central panels the red fluorescence of photosynthetic pigments and the right panel the merged picture of the former ones. V, vegetative cells; H, heterocyst.

that an *Anabaena* mutant where CAAD had been deleted from ValRS^C (similar to the Δ^C mutant) was impaired for growth upon nitrogen depletion (induced by treatment with L-methionine sulfoximine, MSX), we assessed the ATP content of wild type and Δ^C cells growing in the absence or presence of MSX. No significant differences were observed between wild type or Δ^C cells growing under standard or nitrogen-depleted conditions (Figure S3B).

DISCUSSION

Recurrent Acquisition of CAAD by Cyanobacterial aaRSs in Evolution

Previous work demonstrated the existence of CAAD in four class I aaRS, namely GluRS, LeuRS, ValRS, and IleRS in different cyanobacterial species (Luque et al., 2008; Olmedo-Verd et al., 2011). The fast accumulation of genome sequences in recent years has allowed the unveiling of new species bearing these aaRSs^C and species where CAAD is inserted in additional aaRSs, namely ArgRS, MetRS, and CysRS. Thus, as more genomes are sequenced, the variety of aaRSs containing CAAD increases, raising the question of whether there exist other aaRSs^C that are still to be discovered. A common feature of aaRSs^C identified thus far is that they belong to class I and they are all monomeric. AaRSs not observed to contain CAAD are either of class I (TyrRS and TrpRS) or class II, and are all dimeric or tetrameric. It is possible that for these oligomeric aaRSs, anchoring of

each individual subunit to the membrane would posit structural constraints for the assembly of the functional oligomer, making less likely the recruitment of CAAD by these enzymes.

CAAD most likely originated by *domain shuffling* (Di Roberto and Peisajovich, 2014), a loosely defined phenomenon by which genes acquire or lose sequences encoding individual modules. In the case of GluRS, CAAD acquisition probably happened by fusion of neighboring genes, which is consistent with the observation of contiguous *gltX* and *curt1* genes in species closely-related to those containing GluRS^C (i.e., *Lyngbya* sp. PCC 8106, *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Arthrospira maxima* CS-328 or *Oscillatoria* sp. PCC 6506). It is unknown whether insertion of CAAD in other aaRSs^C occurred by recombination, transposition or an alternative mechanism. If CAAD were a sequence that inserts into new locations randomly, footprints would be expected at multiple sites in the genome. Rather than this, specific recruitment by aaRSs is observed. Phylogenetic analysis suggests that at certain points of cyanobacterial evolution, aaRSs-encoding genes independently captured the sequence of a *curt1* gene, which would involve a minimum of eight independent recruitment events, one for each aaRS^C, except for ValRS where CAAD is found at two alternative insertion points. However, phylogenetic analyses of the Curt1/CAAD superfamily indicate multiple recruitment events by ValRS^C, IleRS^C, and LeuRS^C (Figure S1). Some events are recent and the resulting aaRSs^C are restricted to few species (Figure 1, cluster III), whereas others are ancient and can be traced to billion years ago (Figure 1, clusters IV to VII) (Knoll, 2008; Schirrmeyer et al., 2013). A striking and interesting observation is the clustering of CAAD sequences from distinct aaRSs^C in the phylogenetic tree in Figure S1 (clusters labeled as III), which suggests that some aaRSs^C might have acquired CAAD from another aaRS^C, a possibility that warrants further investigation.

The recurrent recruitment of CAAD by distinct aaRSs in cyanobacteria strongly suggests a putative functionality of aaRSs^C in the thylakoid membrane. It is thus intriguing that aaRSs^C do not exist in plant chloroplasts, which derive from ancient cyanobacteria and contain CURT1 proteins. This may be due to the fact that the cyanobacterial ancestor of chloroplasts did not contain any aaRS^C and posterior recruitment events have not taken place in the evolution of chloroplasts. It should be also noticed that in *Arabidopsis thaliana*, only nine of the plastidic aaRSs (including GluRS and IleRS) are of cyanobacterial origin, the others having been replaced by aaRSs of cytoplasmic or mitochondrial origin. Targeting of aaRSs (including plastidic GluRS and IleRS) to multiple compartments in the cell is the general rule in plants (Duchene et al., 2005), which may have disfavor the existence of aaRSs^C in plant plastids.

A Global Picture of the Subcellular Distribution of aaRSs in Cyanobacterial Cells

Though it was known that in *Anabaena* ValRS^C localized specifically at thylakoid membranes (Olmedo-Verd et al., 2011), it remained to be investigated whether other aaRSs^C also localized in the thylakoids. Our attempt to ectopically express

foreign aaRSs^C in *Anabaena* as GFP fusions was hampered by the high toxicity of these enzymes in the host, even when expressed from a controlled promoter. Only LeuRS^C from *Lyngbya* sp. PCC 8106 was successfully expressed and was found to co-localize with photosynthetic pigments at the thylakoids (**Figure 2A**). This is consistent with the previous observation of LeuRS activity in membrane fractions from *Lyngbya* (Olmedo-Verd et al., 2011) and argues in favor of the localization of all aaRSs^C at the thylakoid membranes of the corresponding species. Consistent with this view is the intrinsic membrane-targeting ability of CAAD observed in cyanobacteria (Olmedo-Verd et al., 2011) and *E. coli* (**Figure 2B**). The inherent ability of CAAD to insert in a lipid bilayer (i.e., the plasma membrane of *E. coli*) raises the question of how in cyanobacteria it specifically inserts in thylakoid membranes. Plausible hypotheses are the existence of a cue that attracts CAAD for specific insertion in thylakoids or the existence of an interacting partner that captures CAAD in these membranes. Either role could be played by the interaction with ATP synthase described in this work.

The information available on the subcellular localization of aaRSs lacking CAAD was scanty. In this work we provide a global view for the subcellular distribution of the full complement of aaRSs in *Anabaena*. Analysis of GFP fusions for all 20 aaRSs indicated that with the exception of ValRS^C, all other aaRSs are soluble. Though this is not in line with our hypothesis that ValRS^C could attract other aaRSs for the formation of translational foci on the surface of thylakoids, we cannot rule out that these foci formed only under specific conditions. In this sense it is worth mentioning that in *Synechocystis* sp. PCC 6803, components of the translational machinery, including β -GlyRS, were observed to form aggregates on the surface of thylakoid and plasma membranes under high light stress (Bryan et al., 2014).

Identification of aaRSs Interacting Partners

The asymmetric subcellular distribution of aaRSs in many cyanobacterial species is intriguing. To get an insight on the basis for this differential distribution, interactions of each aaRS with other proteins were investigated in *Anabaena*. A number of soluble aaRSs, including IleRS, CysRS, TyrRS, TrpRS, AlaRS, HisRS, ProRS, and AsnRS appeared not to form stable complexes. By contrast, indications of putative interactions of LeuRS, ArgRS, MetRS, GluRS, T1, SerRS, LysRS, and AspRS with other proteins were obtained (Table S4). These putative interactions would need to be validated by alternative approaches and further investigated. Particularly interesting are the observations indicating a possible interaction of SerRS, LeuRS, MetRS, and T1 with EF-Tu. Since co-purification of these aaRSs with each other was not observed, it appears that EF-Tu would establish binary interactions with each of them rather than acting as a hub for the formation of a large multi-synthetase complex. Several aaRSs have been reported to interact with EF-Tu in bacteria or with its homolog EF1A in archaea or eukaryotes (Motorin et al., 1991; Bec et al., 1994; Reed et al., 1994; Negrutskii et al., 1999; Hausmann et al., 2007; Guzzo and Yang, 2008). AaRSs and elongation factor Tu and 1A perform successive steps in

translation: the aminoacylation of tRNA and the delivery of the aminoacyl-tRNA to the ribosome, respectively. Therefore, the interaction of aaRSs with EF-Tu or EF1A is thought to favor the transfer of aminoacyl-tRNAs to the ribosome. Direct association of aaRSs with ribosomes has been observed in archaea (Godinic-Mikulcic et al., 2011; Raina et al., 2012) and eukaryotes (David et al., 2011), lending support to the idea that the channeling of aminoacyl-tRNAs to the ribosome is advantageous (Negrutskii and Deutscher, 1991; Stapulionis and Deutscher, 1995; Kyriacou and Deutscher, 2008; Mirande, 2010).

AaRSs frequently form protein complexes in archaea and eukaryotes, while in bacteria it is less common (Hausmann and Ibba, 2008). Some protein interactions contribute to the canonical function of aaRSs in translation, either by facilitating the contact with the tRNA substrate, by enhancing the aminoacylation activity or by favoring substrate channeling (Motorin et al., 1991; Bec et al., 1994; Reed et al., 1994; Simos et al., 1996; Negrutskii et al., 1999; Rocak et al., 2002; Praetorius-Ibba et al., 2005, 2007; Godinic et al., 2007; Hausmann et al., 2007; Guzzo and Yang, 2008; Godinic-Mikulcic et al., 2011). Besides, numerous aaRSs are moonlighting proteins with alternative functions different from their canonical role in gene translation and performing such non-canonical functions often entails interactions with alternative partners distinct from their regular partners in translation. Such interactions may occur through extra domains appended to the conserved body of the aaRS (Sampath et al., 2004; Guo et al., 2010; Kim et al., 2012; Ofir-Birin et al., 2013).

In this work, the interaction of ValRS^C with the FoF1 ATP synthase complex was unveiled. Such interaction was repeatedly observed by multiple alternative approaches. Purification of ValRS^C-GFP from whole cell extracts (**Figure 5A**) or membrane fractions (**Figure 5B**) repetitively pulled out subunits α (AtpA), β (AtpB) and, in some cases, subunit γ (AtpC) of the FoF1-ATP synthase complex. Artifacts derived from the use of particular tags were ruled out (**Figures 5A–D**). However, it could be argued that similar to RuBisCO, a frequent contaminant in our purifications (indicated by an asterisk in **Figures 5, 6**), ATP synthase subunits appeared in our gels just because of their abundance. This possibility was discarded by reciprocal co-purification of ValRS^C with GFP-tagged AtpA. In *Anabaena*, AtpA-GFP showed a thylakoidal localization and co-purified with most subunits of the ATP synthase, indicating an effective integration in the FoF1 complex. Further support for the proposed interaction between ValRS^C and ATP synthase was derived from CN-PAGE experiments. In these gels, ATP synthase subunits were observed in two complexes (**Figure 7**) and its presence in the high molecular weight complex was dependent on the presence of ValRS^C in the membrane. Both ValRS^C-GFP and AtpA-GFP localized in thylakoid membranes in vegetative cells, however, in heterocysts they showed an overlapping though not totally coincident distribution enriched at the cell poles indicating that in these cells their interaction could be restricted to the cell poles (**Figure 8**).

An Insight on the Function of the ValRS^C-ATP Synthase Interaction

The functional consequences of the interaction of ValRS^C with ATP synthase were investigated. Interaction with ATP synthase occurs through CAAD (Figure 5C) and deletion of such domain in the Δ^C mutant has two consequences, the disruption of the interaction with ATP synthase and the conversion of the synthetase to a soluble form in the cytoplasm. However, deletion of CAAD does not alter the catalytic parameters (K_M for tRNA, L-Val or ATP and k_{cat}) of the enzyme (Olmedo-Verd et al., 2011). The interaction was deduced to have little impact on ValRS^C catalysis as wild type cells and cells of the Δ^C mutant showed similar tRNA^{Val} charging activity (Figure S3A). Thus, the alternative hypothesis that the interaction would affect ATP synthase functioning was considered. The FoF1 complex possesses both ATP synthase and ATP hydrolase activity, and both need to be finely tuned to the cell status (Gledhill et al., 2007; Giorgio et al., 2009; Hisabori et al., 2013). In photosynthetic organisms, it is well-known that the functioning of the FoF1 complex is tightly regulated by redox and metabolic stimuli, which is required for optimal performance and adaptation to light conditions (Konno et al., 2006; Imashimizu et al., 2011; Kramer and Evans, 2011; Hisabori et al., 2013; Kohzuma et al., 2013). ATP levels were used as an indicator of the functioning of the FoF1 complex and were found to be similar in wild type and Δ^C cells. Given that we had previously observed retarded growth in an *Anabaena* mutant lacking the CAAD domain of ValRS (similar to the Δ^C mutant) in nitrogen depleted conditions, we hypothesized that ValRS could monitor the nitrogen status by acting as a sensor of amino acid levels (i.e., by sensing valine) and transduce this signal to the FoF1 complex in order to adjust its functioning. Such signaling role would be analogous to that recently proposed for LeuRS in yeasts and mammals (Bonfils et al., 2012; Han et al., 2012). This hypothesis was particularly attractive since in principle, any aaRS could act as an amino acid sensor and therefore, provided that the variety of aaRS^C present in other species interact with the FoF1 complex, they could each play the same role in their host by sensing their cognate amino acid and transducing such information. However, no significant differences in the ATP levels were observed between wild type *Anabaena* or Δ^C cells under standard or nitrogen depleted conditions (Figure S3B). Though these results do not confirm our hypothesis, it is possible that the impact of the interaction on the functioning of the FoF1 complex is subtle and would

not be reflected in the ATP content of the cell. Therefore the functional consequences of the interaction would need to be further investigated by detailed analyses of the ATP synthase and hydrolase activity of the FoF1 complex.

Membrane localization is unusual for aaRSs. Membrane-associated aaRSs have been described in other organisms (Castro De Moura et al., 2011; Kim et al., 2012) but only in cyanobacteria there exist permanently-anchored and catalytically-active aaRSs in the thylakoid membrane. The observed interaction of ValRS^C with the FoF1 ATP synthase complex unveiled in this work hints to a possible moonlighting function of ValRS^C, which would need to be further investigated. Elucidation of this putative role would help understand the basis for the asymmetric distribution of aaRSs observed in these organisms. We do not rule out however, the possibility that ATP synthase plays a moonlighting role in the context of the complex with ValRS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JO and IL conceived and designed research; JS, EO, RB, and IL performed experiments; all authors analyzed and interpreted the data and IL wrote the manuscript

FUNDING

This work was supported by grants BFU2010-19544 and BFU2013-44686-P from Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and FEDER.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Victoria Merino-Puerto, Enrique Flores and Antonia Herrero for the generous gift of the *Anabaena* strain expressing the fusion protein Amt1-GFP. We are thankful to A. Herrero for a critical reading of the manuscript and to Rocío Rodríguez, Alicia Orea and Susana Sellés-Marchart for excellent technical assistance. We are grateful to CIPRES Gateway for their support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00857>

REFERENCES

- Armbruster, U., Labs, M., Pribil, M., Viola, S., Xu, W., Scharfenberg, M., et al. (2013). Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature. *Plant Cell* 25, 2661–2678. doi: 10.1105/tpc.113.113118
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., et al. (eds.). (2010). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Greene Publishing & Wiley-Interscience.
- Bec, G., Kerjan, P., and Waller, J. P. (1994). Reconstitution *in vitro* of the valyl-tRNA synthetase-elongation factor (EF) 1 beta gamma delta complex. Essential roles of the NH2-terminal extension of valyl-tRNA synthetase and of the EF-1 delta subunit in complex formation. *J. Biol. Chem.* 269, 2086–2092.
- Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., and de Virgilio, C. (2012). Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol. Cell* 46, 105–110. doi: 10.1016/j.molcel.2012.02.009
- Bryan, S. J., Burroughs, N. J., Shevela, D., Yu, J., Rupprecht, E., Liu, L.-N., et al. (2014). Localisation and interactions of the Vipp1 protein in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 94, 1179–1195. doi: 10.1111/mmi.12826
- Castro De Moura, M., Miro, F., Han, J. M., Kim, S., Celada, A., and Ribas de Pouplana, L. (2011). Entamoeba lysyl-tRNA synthetase contains a cytokine-like

- domain with chemokine activity towards human endothelial cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e1398. doi: 10.1371/journal.pntd.0001398
- David, A., Netzer, N., Strader, M. B., Das, S. R., Chen, C. Y., Gibbs, J., et al. (2011). RNA binding targets aminoacyl-tRNA synthetases to translating ribosomes. *J. Biol. Chem.* 286, 20688–20700. doi: 10.1074/jbc.M110.209452
- Di Roberto, R. B., and Peisajovich, S. G. (2014). The role of domain shuffling in the evolution of signaling networks. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 322, 65–72. doi: 10.1002/jez.b.22551
- Duchene, A. M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N. M., et al. (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16484–16489. doi: 10.1073/pnas.0504682102
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347, 203–206. doi: 10.1038/347203a0
- Francklyn, C. S., First, E. A., Perona, J. J., and Hou, Y. M. (2008). Methods for kinetic and thermodynamic analysis of aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods* 44, 100–118. doi: 10.1016/j.jymeth.2007.09.007
- Giorgio, V., Bisetto, E., Soriano, M. E., Dabbeni-Sala, F., Basso, E., Petronilli, V., et al. (2009). Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J. Biol. Chem.* 284, 33982–33988. doi: 10.1074/jbc.M109.020115
- Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2007). How the regulatory protein, IF(1), inhibits F₁-ATPase from bovine mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15671–15676. doi: 10.1073/pnas.0707326104
- Godinic, V., Mocibob, M., Rocak, S., Ibba, M., and Weyand-Durasevic, I. (2007). Peroxin Pex21p interacts with the C-terminal noncatalytic domain of yeast seryl-tRNA synthetase and forms a specific ternary complex with tRNA(Ser). *FEBS J.* 274, 2788–2799. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05812.x
- Godinic-Mikulcic, V., Jaric, J., Hausmann, C. D., Ibba, M., and Weyand-Durasevic, I. (2011). An archaeal tRNA-synthetase complex that enhances aminoacylation under extreme conditions. *J. Biol. Chem.* 286, 3396–3404. doi: 10.1074/jbc.M110.168526
- Guo, M., Schimmel, P., and Yang, X. L. (2010). Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions. *FEBS Lett.* 584, 434–442. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.064
- Guzzo, C. M., and Yang, D. C. (2008). Lysyl-tRNA synthetase interacts with EF1 α , aspartyl-tRNA synthetase and p38 *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 718–723. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.028
- Han, J. M., Jeong, S. J., Park, M. C., Kim, G., Kwon, N. H., Kim, H. K., et al. (2012). Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 149, 410–424. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.044
- Hausmann, C. D., and Ibba, M. (2008). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 705–721. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00119.x
- Hausmann, C. D., Praetorius-Ibba, M., and Ibba, M. (2007). An aminoacyl-tRNA synthetase:elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic Acids Res.* 35, 6094–6102. doi: 10.1093/nar/gkm534
- Hisabori, T., Sunamura, E. I., Kim, Y., and Konno, H. (2013). The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1846–1854. doi: 10.1089/ars.2012.5044
- Ibba, M., and Soll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 617–650. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.617
- Imashimizu, M., Bernat, G., Sunamura, E., Broekmans, M., Konno, H., Isato, K., et al. (2011). Regulation of F₀F₁-ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by gamma and epsilon subunits is significant for light/dark adaptation. *J. Biol. Chem.* 286, 26595–26602. doi: 10.1074/jbc.M111.234138
- Kim, D. G., Choi, J. W., Lee, J. Y., Kim, H., Oh, Y. S., Lee, J. W., et al. (2012). Interaction of two translational components, lysyl-tRNA synthetase and p40/37LRP, in plasma membrane promotes laminin-dependent cell migration. *FASEB J.* 26, 4142–4159. doi: 10.1096/fj.12-207639
- Knoll, A. H. (2008). “Cyanobacteria and earth history,” in *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*, eds A. Herrero and E. Flores. (Norfolk, UK: Caister Academic Press), 1–19.
- Kohzuma, K., Dal Bosco, C., Meurer, J., and Kramer, D. M. (2013). Light- and metabolism-related regulation of the chloroplast ATP synthase has distinct mechanisms and functions. *J. Biol. Chem.* 288, 13156–13163. doi: 10.1074/jbc.M113.453225
- Konno, H., Murakami-Fuse, T., Fujii, F., Koyama, F., Ueoka-Nakanishi, H., Pack, C. G., et al. (2006). The regulator of the F₁ motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F₁-ATPase by the epsilon subunit. *EMBO J.* 25, 4596–4604. doi: 10.1038/sj.emboj.7601348
- Kopečna, J., Komenda, J., Bucinska, L., and Sobotka, R. (2012). Long-term acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light is accompanied by an enhanced production of chlorophyll that is preferentially channeled to trimeric photosystem I. *Plant Physiol.* 160, 2239–2250. doi: 10.1104/pp.112.207274
- Kramer, D. M., and Evans, J. R. (2011). The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Plant Physiol.* 155, 70–78. doi: 10.1104/pp.110.166652
- Krause, F., and Seelert, H. (2008). Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis. *Curr. Protoc. Protein Sci. Chapter 19, Unit 19.18*. doi: 10.1002/0471140864.ps1918s54
- Kyriacou, S. V., and Deutscher, M. P. (2008). An important role for the multienzyme aminoacyl-tRNA synthetase complex in mammalian translation and cell growth. *Mol. Cell* 29, 419–427. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.038
- Laporte, D., Huot, J. L., Bader, G., Enkler, L., Senger, B., and Becker, H. D. (2014). Exploring the evolutionary diversity and assembly modes of multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes: lessons from unicellular organisms. *FEBS Lett.* 588, 4268–4278. doi: 10.1016/j.febslet.2014.10.007
- Lartillot, N., Lepage, T., and Blanquart, S. (2009). PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. *Bioinformatics* 25, 2286–2288. doi: 10.1093/bioinformatics/btp368
- Lartillot, N., Rodrigue, N., Stubbs, D., and Richer, J. (2013). PhyloBayes MPI: phylogenetic reconstruction with infinite mixtures of profiles in a parallel environment. *Syst. Biol.* 62, 611–615. doi: 10.1093/sysbio/syt022
- Liberton, M., and Pakrasi, H. B. (2008). “Membrane systems in cyanobacteria,” in *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*, eds E. Flores and A. Herrero. (Norfolk, UK: Caister Academic Press), 271–288.
- Luque, I., and Ochoa de Alda, J. A. G. (2014). CURT1, CAAD-containing aaRSs, thylakoid curvature and gene translation. *Trends Plant Sci.* 19, 63–66. doi: 10.1016/j.tplants.2013.12.004
- Luque, I., Riera-Alberola, M. L., Andujar, A., and Ochoa de Alda, J. A. G. (2008). Intraphylum diversity and complex evolution of cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2369–2389. doi: 10.1093/molbev/msn197
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140, 315–322.
- Markwell, M. A., Hass, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210. doi: 10.1016/0003-2697(78)90586-9
- Martinez-Esteso, M. J., Selles-Marchart, S., Vera-Urbina, J. C., Pedreno, M. A., and Bru-Martinez, R. (2011). DIGE analysis of proteome changes accompanying large resveratrol production by grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to methyl-beta-cyclodextrin and methyl jasmonate elicitors. *J. Proteomics* 74, 1421–1436. doi: 10.1016/j.jpro.2011.02.035
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2010). “Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees,” in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* (New Orleans, LA), 1–8.
- Mirande, M. (2010). Processivity of translation in the eukaryote cell: role of aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 584, 443–447. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.027
- Mirande, M., Gache, Y., Le Corre, D., and Waller, J. P. (1982). Seven mammalian aminoacyl-tRNA synthetases co-purified as high molecular weight entities are associated within the same complex. *EMBO J.* 1, 733–736.
- Montero Llopis, P., Jackson, A. F., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T., et al. (2010). Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature* 466, 77–81. doi: 10.1038/nature09152
- Motorin, Y. A., Wolfson, A. D., Lohr, D., Orlovsky, A. F., and Gladilin, K. L. (1991). Purification and properties of a high-molecular-mass complex between Val-tRNA synthetase and the heavy form of elongation factor 1 from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 201, 325–331. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16289.x
- Napolitano, M., Rubio, M. A., Santamaría-Gómez, J., Olmedo-Verd, E., Robinson, N. J., and Luque, I. (2012). Characterization of the response to zinc deficiency

- in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 194, 2426–2436. doi: 10.1128/JB.00090-12
- Negrutskii, B. S., and Deutscher, M. P. (1991). Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4991–4995. doi: 10.1073/pnas.88.11.4991
- Negrutskii, B. S., Shalak, V. F., Kerjan, P., El'skaya, A. V., and Mirande, M. (1999). Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1 α in the complex with EF-1H. *J. Biol. Chem.* 274, 4545–4550. doi: 10.1074/jbc.274.8.4545
- Ochoa de Alda, J. A. G., Esteban, R., Diago, M. L., and Houmard, J. (2014). The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nat. Commun.* 5:4937. doi: 10.1038/ncomms5937
- Ofir-Birin, Y., Fang, P., Bennett, S. P., Zhang, H. M., Wang, J., Rachmin, I., et al. (2013). Structural switch of lysyl-tRNA synthetase between translation and transcription. *Mol. Cell* 49, 30–42. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.010
- Olmedo-Verd, E., Santamaría-Gómez, J., Ochoa de Alda, J. A. G., Ribas de Pouplana, L., and Luque, I. (2011). Membrane anchoring of aminoacyl-tRNA synthetases by convergent acquisition of a novel protein domain. *J. Biol. Chem.* 286, 41057–41068. doi: 10.1074/jbc.M111.242461
- Praetorius-Ibba, M., Hausmann, C. D., Paras, M., Rogers, T. E., and Ibba, M. (2007). Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* 282, 3680–3687. doi: 10.1074/jbc.M609988200
- Praetorius-Ibba, M., Rogers, T. E., Samson, R., Kelman, Z., and Ibba, M. (2005). Association between Archaeal prolyl- and leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA(Pro) aminoacylation. *J. Biol. Chem.* 280, 26099–26104. doi: 10.1074/jbc.M503539200
- Raina, M., Elgamal, S., Santangelo, T. J., and Ibba, M. (2012). Association of a multi-synthetase complex with translating ribosomes in the archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *FEBS Lett.* 586, 2232–2238. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.039
- Reed, V. S., Wastney, M. E., and Yang, D. C. (1994). Mechanisms of the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 α . *J. Biol. Chem.* 269, 32932–32936.
- Ribas de Pouplana, L., and Schimmel, P. (2001). Two classes of tRNA synthetases suggested by sterically compatible dockings on tRNA acceptor stem. *Cell* 104, 191–193. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00204-5
- Rippka, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria. *Meth. Enzymol.* 167, 3–27. doi: 10.1016/0076-6879(88)67004-2
- Rocak, S., Landeka, I., and Weygand-Durasevic, I. (2002). Identifying Pex21p as a protein that specifically interacts with yeast seryl-tRNA synthetase. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 101–106. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11331.x
- Rubio, M. A., Napolitano, M., Ochoa de Alda, J. A. G., Santamaría-Gómez, J., Patterson, C. J., Foster, A. W., et al. (2015). Trans-oligomerization of duplicated aminoacyl-tRNA synthetases maintains genetic code fidelity under stress. *Nucleic Acids Res.* 43, 9905–9917. doi: 10.1093/nar/gkv1020
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C. A., Chavatte, L., Kinter, M., et al. (2004). Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* 119, 195–208. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.030
- Schirrmeister, B. E., De Vos, J. M., Antonelli, A., and Bagheri, H. C. (2013). Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1791–1796. doi: 10.1073/pnas.1209927110
- Schon, A., Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, C. G., and Soll, D. (1986). The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* 322, 281–284. doi: 10.1038/32281a0
- Shapiro, L., Mcadams, H. H., and Losick, R. (2009). Why and how bacteria localize proteins. *Science* 326, 1225–1228. doi: 10.1126/science.1175685
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858. doi: 10.1021/ac950914h
- Simonetti, A., Marzi, S., Jenner, L., Myasnikov, A., Romby, P., Yusupova, G., et al. (2009). A structural view of translation initiation in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 423–436. doi: 10.1007/s00018-008-8416-4
- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M., et al. (1996). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* 15, 5437–5448.
- Sobotka, R., Mclean, S., Zuberova, M., Hunter, C. N., and Tichy, M. (2008). The C-terminal extension of ferrochelatase is critical for enzyme activity and for functioning of the tetrapyrrole pathway in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 190, 2086–2095. doi: 10.1128/JB.01678-07
- Sorek, R., Zhu, Y., Creevey, C. J., Francino, M. P., Bork, P., and Rubin, E. M. (2007). Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science* 318, 1449–1452. doi: 10.1126/science.1147112
- Stapulionis, R., and Deutscher, M. P. (1995). A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7158–7161. doi: 10.1073/pnas.92.16.7158
- Staron, P., Forchhammer, K., and Maldener, I. (2011). Novel ATP-driven pathway of glycolipid export involving TolC protein. *J. Biol. Chem.* 286, 38202–38210. doi: 10.1074/jbc.M111.269332
- Wittig, I., Karas, M., and Schagger, H. (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1215–1225. doi: 10.1074/mcp.M700076-MCP200
- Yeates, T. O., Kerfeld, C. A., Heinhorst, S., Cannon, G. C., and Shively, J. M. (2008). Protein-based organelles in bacteria: carboxysomes and related microcompartments. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 681–691. doi: 10.1038/nrmicro1913

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Santamaría-Gómez, Ochoa de Alda, Olmedo-Verd, Bru-Martínez and Luque. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Membrane Anchoring of Aminoacyl-tRNA Synthetases by Convergent Acquisition of a Novel Protein Domain^{*[5]}

Received for publication, March 22, 2011, and in revised form, September 23, 2011 Published, JBC Papers in Press, September 30, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.242461

Elvira Olmedo-Verd[‡], Javier Santamaría-Gómez[‡], Jesús A. G. Ochoa de Alda[§], Lluís Ribas de Pouplana^{¶||}, and Ignacio Luque^{‡1}

From the [‡]Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, C.S.I.C. and Universidad de Sevilla, Avda Américo Vespucio 49, E-41092 Seville, the [§]School of Biology, IE University, Campus de Santa Cruz la Real, c/Cardenal Zúñiga 12, E-40003 Segovia, the [¶]Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), c/Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Catalonia, and the ^{||}ICREA, Passeig Lluís Companys 1, Barcelona 08010, Catalonia, Spain

Background: Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are enzymes that couple tRNAs to their cognate amino acids.

Results: aaRSs from cyanobacteria containing the novel CAAD protein domain are localized in the thylakoid membrane.

Conclusion: Confinement of aaRSs to the membrane is advantageous for cyanobacteria under specific conditions.

Significance: These findings provide the first description of membrane-bound aaRSs.

Four distinct aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) found in some cyanobacterial species contain a novel protein domain that bears two putative transmembrane helices. This CAAD domain is present in glutamyl-, isoleucyl-, leucyl-, and valyl-tRNA synthetases, the latter of which has probably recruited the domain more than once during evolution. Deleting the CAAD domain from the valyl-tRNA synthetase of *Anabaena* sp. PCC 7120 did not significantly modify the catalytic properties of this enzyme, suggesting that it does not participate in its canonical tRNA-charging function. Multiple lines of evidence suggest that the function of the CAAD domain is structural, mediating the membrane anchorage of the enzyme, although membrane localization of aaRSs has not previously been described in any living organism. Synthetases containing the CAAD domain were localized in the intracytoplasmic thylakoid membranes of cyanobacteria and were largely absent from the plasma membrane. The CAAD domain was necessary and apparently sufficient for protein targeting to membranes. Moreover, localization of aaRSs in thylakoids was important under nitrogen limiting conditions. In *Anabaena*, a multicellular filamentous cyanobacterium often used as a model for prokaryotic cell differentiation, valyl-tRNA synthetase underwent subcellular relocation at the cell poles during heterocyst differentiation, a process also dependent on the CAAD domain.

Aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs)² are substrates for protein synthesis at the ribosomes and they perform several other cel-

lular functions (1, 2). These aa-tRNAs are synthesized by aminoacyl-tRNA synthetases (3), which couple each tRNA with its cognate L-amino acid. Thus, the rules of the genetic code are dictated by the double specificity of aaRSs for L-amino acids and tRNAs with particular anticodons. The reaction catalyzed by aaRSs occurs in two successive steps: activation of the amino acid with ATP, forming an aminoacyl adenylate intermediate; followed by the transfer of the amino acid moiety to the 3' acceptor end of the tRNA (3). Despite the common catalytic mechanism, aaRSs have been categorized into two unrelated classes based on sequence and structure criteria (4–7). Enzymes of the same class are thought to be derived from a common ancestral protein that arose very early in evolution, and that diversified through divergence and multiple gene duplication events (8). Class I aaRSs are often monomeric and exhibit a characteristic nucleotide-binding Rossmann-fold in their catalytic domain. By contrast, class II enzymes are dimeric or tetrameric with a catalytic domain formed by anti-parallel β strands surrounded by α helices (5). As modular proteins, aaRS have evolved by the acquisition (and/or loss) of protein domains, which have been appended to the catalytic domain, and are involved in a variety of functions (see below and Refs. 9 and 10). Some domains are present in one or multiple aaRSs and are universally distributed in nature. Such domains must have been recruited very early in evolution. Other domains are restricted to one or a few aaRSs in specific phyla, suggesting that they were acquired more recently. A domain appended to a particular aaRS in some organisms may exist in other organisms as a stand-alone polypeptide operating in *trans* to perform the same function (11, 12). The number of appended domains in a particular aaRS tends to be greater in more complex organisms, leading to the proposal that domain recruitment by aaRSs is an accretive and progressive phenomenon during evolution (13, 14).

The function of some appended domains may be related to the canonical aminoacylation activity of aaRSs. Thus, some

^{*} This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación and Fondo Social Europeo Grants BFU2007-66589/BMC and BFU2010-19544/BMC, Junta de Castilla y León Grant IEU002A10-2, and Proyectos de Excelencia, Junta de Andalucía y FEDER Grant P07-CVI-03167.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table S1 and Figs. S1–S3.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-954-489521; Fax: 34-954-460065; E-mail: ignacio.luque@ibvf.csic.es.

² The abbreviations used are: aa-tRNA, aminoacyl-tRNA; aaRS, aminoacyl-tRNA synthetases; GluRS, glutamyl-tRNA synthetase; ValRS, valyl-tRNA synthetase; LeuRS, leucyl-tRNA synthetase; IleRS, isoleucyl-tRNA synthetase; IPTG, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside; HMM, hidden Markov model;

MSX, L-methionine sulfoximine; CAAD, cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetases appended domain.

domains are involved in tRNA binding, augmenting their affinity (and in some cases specificity) for the tRNA (15, 16), whereas other domains may participate in editing functions, *i.e.* the hydrolysis of ester bonds mistakenly established by the synthetase between the tRNA and a noncognate amino acid (17). Some other domains participate in cellular functions unrelated to the aminoacylation reaction (13, 14, 18). For instance, the WHEP domain of eukaryotic GluProRS is involved in translational control of genes encoding proinflammatory proteins by directly interacting with the GAIT element in the 3'-UTR of target mRNAs (19, 20).

Convergent recruitment of a particular protein domain by distinct aaRSs has been described, for instance, the internal editing domain of AlaRS is homologous to the N-terminal editing domain of bacterial/eukaryotic ThrRS (21, 22). Furthermore, in eukaryotes GST, WHEP, or EMAP II domains are present in different aaRSs (13, 14).

We have recently described that several cyanobacterial genomes contain genes of anomalous length encoding some class I aaRS, including glutamyl-tRNA synthetase (GluRS), valyl-tRNA synthetase (ValRS), leucyl-tRNA synthetase (LeuRS), and isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS). These aaRSs contained a foreign sequence of 100–200 amino acids with two putative transmembrane helices, which we termed the CAAD domain (for cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetases appended domain) (23). The presence of CAAD-containing aaRSs is not universal in the phylum but rather, it is restricted to certain species, indicating that multiple acquisition events probably occurred during the diversification of the different lineages. In the corresponding genomes, genes encoding these aaRSs are found in a single copy, indicating that their products are functional. Here, we characterize the CAAD domain at the functional level and present evidence demonstrating the structural role of CAAD in anchoring aaRSs to the membrane.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Organisms and Growth Conditions—*Anabaena* sp. PCC 7120 and derivative strains were cultured in BG11 medium (24) under continuous illumination ($75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unless otherwise indicated), at 30 °C in shaken liquid cultures or bubbled with a mixture of CO₂ and air (1% v/v). Bubbled cultures were supplemented with 10 mM NaHCO₃. Solid medium was prepared by the addition of 1% Difco agar. Antibiotics for the selection of manipulated strains were used at the following concentrations: neomycin, 10–50 $\mu\text{g ml}^{-1}$; streptomycin 2–5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; and spectinomycin 2–5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. To induce heterocysts, bubbled cultures of *Anabaena* grown in BG11 medium were harvested, washed twice with BG11₀ medium (similar to BG11 but lacking NaNO₃), inoculated in BG11₀ medium supplemented with 10 mM NaHCO₃, and cultured for 24 h at 30 °C under continuous illumination. For growth tests, cultures were supplemented with different inhibitors at the following concentrations: L-methionine sulfoximine, 1–7.5 μM ; sulfometuron methyl, 0.01–0.1 μM ; chloramphenicol, 1–5 $\mu\text{g/ml}$; and hydrogen peroxide, 1–5 mM.

Escherichia coli was routinely grown in LB medium supplemented with antibiotics at standard concentrations when necessary (25). DH5 α and XL1-blue strains were used for standard

cloning and the C41(DE3) strain for the overexpression of *Anabaena* ValRS::His and ValRS Δ CAAD::His proteins under control of the T7 promoter. Expression of the T7 RNA polymerase in C41(DE3) cells was induced by addition of IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) at a final concentration of 0.4 mM.

Cell Fractionation—Cyanobacterial cell fractionation was carried out and membrane preparations were obtained according to the protocol described by Sobotka *et al.* (26), with some modifications. Cells from 600–700-ml cultures of cyanobacteria were harvested by centrifugation, washed with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), and resuspended in buffer T (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, and 20% (v/v) glycerol) at a ratio of 5 ml of buffer T/g of cell pellet (wet weight). Cells were disrupted in the French press at 9000 p.s.i. in the presence of 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) as a protease inhibitor. The cell extracts were centrifuged at $32,000 \times g$ for 10 min at 4 °C to eliminate unbroken cells and cell debris. The supernatant (referred to as the “cell extract”) was ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h at 4 °C. To avoid contamination with the membrane fraction only the top portion (about 75% of the total volume) of the supernatant containing the soluble fraction was saved, whereas the bottom portion in direct contact with the pellet containing the membranes was discarded. The pellet containing the membranes was washed with buffer T and resuspended in the same buffer supplemented with 1% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside. In experiments where membrane purity was paramount, pellets were resuspended in buffer T and ultracentrifuged a second time at $100,000 \times g$ for 1 h at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in the same buffer supplemented with 1% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside. The chlorophyll concentration in cyanobacterial cultures or cell fractions were determined as previously described (27), whereas the protein content was determined by the modified Lowry procedure (28).

E. coli cell fractionation was achieved by resuspending cells from IPTG-induced cultures in buffer A (0.05 M phosphate buffer, pH 8, 0.15 M NaCl, and 10% (v/v) glycerol) and then disrupting them in the French press at 12,000 p.s.i. in the presence of 1 mM PMSF. Extracts were centrifuged at $21,000 \times g$ and the supernatant was further centrifuged at $100,000 \times g$. The supernatant containing the soluble fraction was saved and the pellet was washed extensively with buffer A and resuspended in buffer A supplemented with 1% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside.

Strain Construction—The plasmid and strain construction are described under [supplemental data](#). The oligonucleotides used are listed under [supplemental Table S1](#).

Protein Purification—*Anabaena* ValRS::His was purified from *E. coli* C41(DE3, pCE50) membrane preparations. Membranes from 100-ml cultures induced with IPTG (see above) were resuspended in 1 ml of buffer containing 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 20% (v/v) glycerol, 0.04% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside, and 2 mM imidazole, mixed with 1 ml of HIS-Select nickel affinity gel (Sigma), and incubated for 1 h at 4 °C with gentle agitation. The resin was decanted and the supernatant containing nonbound proteins was discarded. The resin was subsequently washed in successive steps with buffer containing 0, 5, and 10 mM imidazole.

Bound proteins were recovered by step elution with buffer containing 100, 150, and 200 mM imidazole. The fractions containing ValRS::His were pooled and subjected to gel filtration in PD-10 columns (GE Healthcare) for buffer exchange. Purified protein was stored in buffer containing 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 20% (v/v) glycerol, and 1% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside. ValRS Δ CAAD::His was purified from the soluble fraction of *E. coli* C41(DE3, pCE53) cells induced with IPTG (see above) by nickel affinity chromatography using His-Trap HP columns (GE Healthcare).

Protein Electrophoresis, Western Blotting, and In-gel Fluorescence—Proteins were resolved by SDS-PAGE in the Miniprotean III apparatus (Bio-Rad) and transferred to Hybond-P PVDF membranes (GE Healthcare). Western blots were performed as described previously (29). Antibodies against an internal peptide (EYDRKKDESPVEAC) of *Anabaena* ValRS were obtained from rabbits and affinity purified (Genscript, Piscataway, NJ). Penta-His antibodies (Qiagen) were used to detect His-tagged proteins. In-gel fluorescence in SDS-PAGE gels was registered in an Ettan DIGE Imager scanner (GE Healthcare).

tRNA Overexpression and Purification—*E. coli* XL1-Blue strains containing the pCE13, pCE14, or pCE41 plasmids for tRNA^{Val} overexpression and the pCE47 plasmid for that of tRNA^{Leu} were induced with 1 mM IPTG and the total tRNA was extracted as described previously (30). The content of *Anabaena* tRNA^{Val} or *Lyngbya* tRNA^{Leu} was determined in plateau aminoacylation assays.

ATP-PP_i Exchange—The active concentration of functional aaRSs was determined in active site titration assays (31, 32). The K_m for ATP and L-Val were determined by the ATP-PP_i exchange reaction as described previously (32). Standard reaction mixtures containing 50 mM HEPES (pH 7.6), 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 5 mM L-Val, 2 mM ³²PP_i (5 Ci mol⁻¹), and 5–20 nM enzyme were incubated at 30 °C. To determine the K_m , the concentration of ATP or L-Val was varied over a range of 0.2–20-fold the K_m value. Initial velocities of the reactions were plotted against substrate concentration and fitted to the Michaelis-Menten equation to deduce the K_m .

Aminoacylation Reactions—Aminoacylation assays were performed as described previously (32). Standard tRNA charging reactions were incubated at 30 °C and contained 100 mM HEPES (pH 7.2), 20 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 0.1 mg ml⁻¹ BSA, 0.5 mM DTT, 20 μ M ¹⁴C-labeled L-Val (250 Ci mol⁻¹), 10 μ M tRNA, and 5–15 nM enzyme. Reactions were stopped on filters soaked with 5% trichloroacetic acid, washed with 5% trichloroacetic acid, and the radioactivity retained was counted by scintillation.

Bioinformatics—Homologous CAAD domains were retrieved from a PSI-BLAST search until convergence (33) using the CAAD domain of ValRS from *Nostoc punctiforme* as a seed (8 iterations, inclusion threshold <0.005). The resulting sequences were aligned using COBALT (34), exported to Jalview (35) to remove the nonhomologous regions, and realigned using MAFFT (36). This procedure resulted in a multiple alignment of 197 sequences that were used to build a Hidden Markov model (HMM) profile, which in turn was used to search (HMMsearch) against the nr-protein data base (Novem-

ber, 2010). HMMBuild and HMMsearch were implemented into the HMMer3.0 package (37), which was run using Institut Pasteur Mobyle framework (38). Removal of 100% redundancy resulted in 205 unique sequences. Weblogo was used to construct sequence logos from the HMM profile of these sequences (39).

We used the JNet method (40, 41) implemented in Jalview (35) to infer the likely secondary structure of the aligned CAAD domains. The results were confirmed using other secondary structure predicting programs such as Quick2D (42), PSIPRED (43), and PRALINE (44).

We used two different computer methods to predict transmembrane structures, PolyPhobius (45) and TMHMM (46). Both methods provided similar results. For phylogenetic analysis, we followed a pipeline that has been previously described in detail (23), using updated versions of jModelTest (47), PhyML 3.0 (48), and Phylobayes 3.2f (49).

Microscopy—Confocal microscopy of *Anabaena* filaments on solidified medium was performed using a Leica HCX PLAN-APO \times 63 1.4 NA oil immersion objective attached to a Leica TCS SP2 confocal laser-scanning microscope. GFP was excited by 488 nm irradiation from an argon ion laser. Fluorescent emission of GFP and cyanobacterial autofluorescence was monitored by collection across windows of 500–540 and 630–700 nm, respectively.

RESULTS

Sequence and Structural Features of the CAAD Domain—CAAD was found in 4 distinct class I synthetases (GluRS, ValRS, LeuRS, and IleRS) from certain cyanobacterial species but not in the aaRSs from any other organisms (Fig. 1A). In GluRS, CAAD appears as a C-terminal extension connected to the C-terminal anticodon-binding domain by a repetitive sequence. By contrast the CAAD in ValRS, LeuRS, and IleRS are inserted in the C-terminal half of the sequence, in domains that contact the anticodon stem-loop of the tRNA, far from the catalytic domain (Fig. 1A and supplemental Fig. S2).

CAAD domains from the distinct aaRSs exhibit weak sequence identity (about 25% in pairwise sequence comparisons; supplemental Fig. S1) but they invariably share the following common secondary structural features: (i) two putative transmembrane helices at similar positions (although their boundaries may vary slightly depending on the prediction program used) separated by a short connecting peptide of 6–8 amino acids and (ii) an α -helix at the C terminus. Conserved residues concentrated in the second and third helices, and some sequence features are invariant or highly conserved indicating that they are functionally important (Fig. 1B and supplemental Fig. S1). These include the presence of acidic residues in the connecting peptide; a Pro residue at the end of the connecting peptide; Gly, Glu, and Arg residues, and several hydrophobic amino acids in the second helix; an absolutely conserved Arg and a Lys-rich sequence in the third helix; and a Gly residue at the C terminus of the domain (Fig. 1B and supplemental Fig. S1).

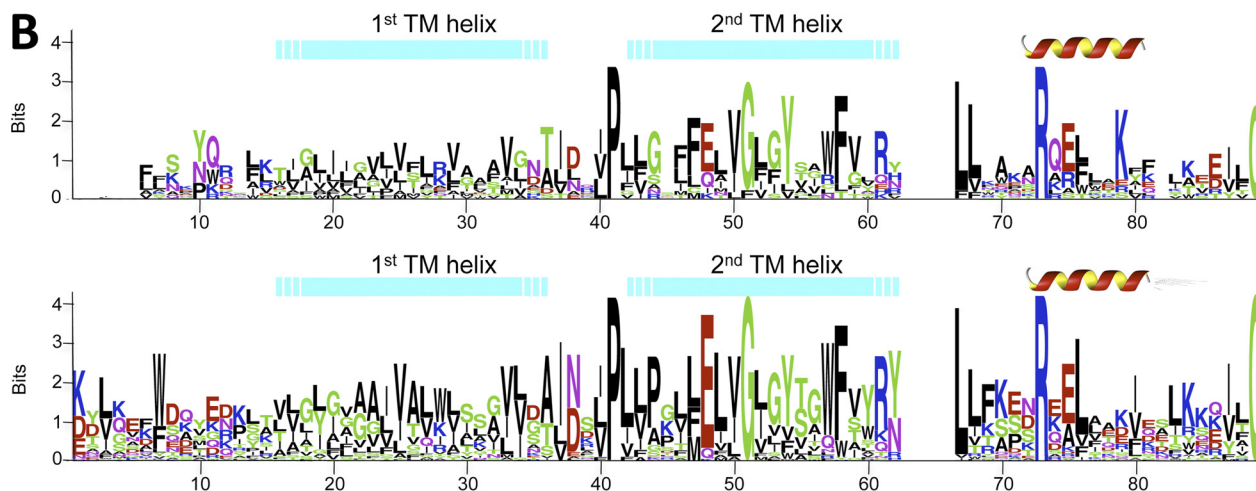
Evolutionary Recruitment of the CAAD Domain by Class I aaRSs—In GluRS, IleRS, and LeuRS, the CAAD was found at a single insertion point, whereas in ValRS it was found at two

Membrane-anchored Aminoacyl-tRNA Synthetases

A

		Approximate position of the insertion	Approximate length of the insertion	Species
GluRS		C-terminal	137	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101
				<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133 <i>Nostoc azollae</i> 0708 <i>Nodularia spumigena</i> 9414 <i>Tolypothrix</i> sp. PCC 7601 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> CS-505 <i>Raphidiopsis brookii</i> D9
ValRS		820	100	HFC
		820	220	
		750	220	
LeuRS		680	150	<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106
IleRS		890	120	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101 <i>Microcoleus chthonoplastes</i> PCC 7420 <i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506

B



C

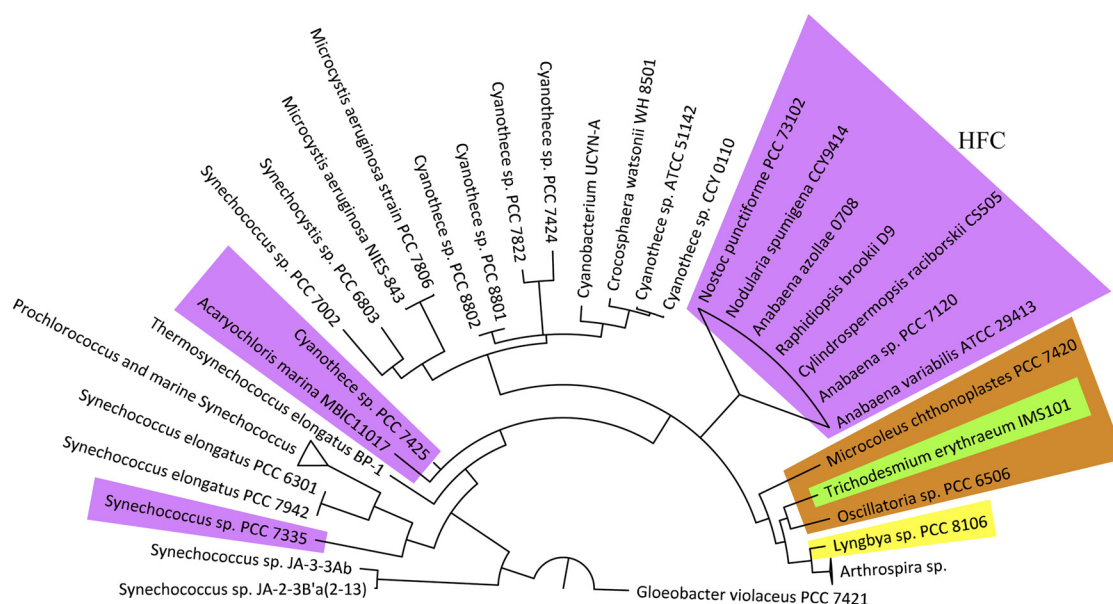


TABLE 1

Kinetic parameters of *Anabaena* ValRS and ValRS Δ CAADAll values represent the mean \pm S.D. of three independent experiments.

	tRNA ^{UAC}	tRNA ^{UAC-2}	K_m tRNA ^{GAC}	L-Val	ATP	k_{cat} s ⁻¹
ValRS	2.08 \pm 0.18	1.08 \pm 0.32	0.61 \pm 0.09 μ M	192.6 \pm 16.8	200.45 \pm 29.05	0.074 \pm 0.002
ValRS Δ CAAD	1.01 \pm 0.13	1.25 \pm 0.09	0.47 \pm 0.03	164.3 \pm 3.4	123.35 \pm 14.55	0.107 \pm 0.013

different insertion points, correlating (with one exception) with two distinct phylogenetic groups (Fig. 1, A and C). Hence, recruitment of this domain by ValRS may have occurred at least twice during evolution. Accordingly, phylogenetic trees based on ValRS sequences (not shown) were congruent with the 16 S guide tree of species evolution (Fig. 1C), which suggests that CAAD insertion arose during expansion of each lineage and not as a consequence of horizontal gene transfer. We also observed that in ValRS from different species, CAAD shows two different sizes, \sim 100 or \sim 220 amino acids (Fig. 1A).

Sequences similar to CAAD are not inserted in other modular proteins in any organism. However, genes encoding single-domain proteins similar to CAAD were found in cyanobacterial and plant genomes. The length of these proteins is similar to that of CAAD (*i.e.* 100–200 amino acids) and they all contain two transmembrane helices. The sequence features observed in CAAD are mostly conserved in CAAD-like proteins (see above). Cyanobacterial genomes contained at least one gene encoding a CAAD homologue, whereas plant genomes contained multiple homologues, up to 12 in *Zea mays*. Interestingly, the plant proteins were nuclear-encoded and all feature transit peptides for chloroplast localization, consistently with their putative cyanobacterial origin.

Impact of the CAAD Domain on tRNA Aminoacylation—We investigated the role CAAD in tRNA binding and catalysis, and the effects of its insertion on the catalytic properties of the enzyme. N-terminal His-tagged ValRS and ValRS Δ CAAD were purified from C41(DE3) *E. coli* cells and their catalytic parameters were analyzed. No significant differences were observed in the K_m for the three tRNA^{Val} encoded in the *Anabaena* genome, or in the K_m for L-Val or ATP (Table 1). Comparison of the k_{cat} for both enzymes revealed no significant differences (Table 1). These results rule out the participation of CAAD in the aminoacylation reaction and indicate that the overall conformation of the remainder of the protein is unaltered by the presence of the CAAD domain. Thus, in ValRS, CAAD appears to minimally affect the interaction with substrates or the release of products.

Subcellular Localization of CAAD-bearing aaRSs—To determine whether CAAD plays a structural role in the aaRS in which it is inserted, we fractionated cell extracts of cyanobacteria containing ValRS, with or without CAAD, by ultracentrif-

ugation. ValRS activity in each fraction was assessed in aminoacylation assays. When the ValRS contains CAAD, as in *Anabaena* sp. PCC 7120, virtually all activity was restricted to the membrane fraction (Fig. 2A). Similar results were obtained with *Tolypothrix* sp. PCC 7601 that also contains a CAAD-bearing ValRS (not shown). Although in *Cyanothece* sp. PCC 7425, the CAAD is longer than that of *Anabaena* and it is inserted at a different location (Fig. 1A), most of the activity in the cell extract was also confined to the membrane fraction (Fig. 2A). By contrast, the activity of the ValRS from *Synechococcus* sp. PCC 7942 that lacks the CAAD domain was only detected in the soluble fraction. We also investigated the localization of LeuRS activity in fractionated extracts from species in which the enzyme contains (*Lyngbya*) or lacks (*Anabaena*) a CAAD. Although most *Lyngbya* LeuRS activity was detected in the membrane, that of *Anabaena* was largely restricted to the soluble fraction (Fig. 2B). These findings suggest a correlation between the presence of the CAAD domain in a particular enzyme and the localization of its activity to the membrane fraction.

As enzymatic activity only reflects the presence of active proteins, the localization of *Anabaena* ValRS in fractionated extracts was further analyzed in Western blots that were probed with antibodies raised against an internal peptide of *Anabaena* ValRS (Fig. 3A). Virtually all of this protein was detected in the membrane fraction, with no traces observed in the soluble fraction. In these experiments, cross-contamination of the fractions was controlled using antibodies against soluble proteins (GluRS and glutamine synthetase) and a membrane protein (the D1 protein of photosystem II).

To determine whether CAAD plays a direct role in protein localization, an *Anabaena* strain termed SR10 was constructed by single recombination integration of a *valS* allele in which the CAAD encoding sequence had been deleted. Integration of this construct into the chromosome disrupts the wild-type allele and situates the mutant allele under control of the *valS* promoter. Complete segregation of the mutant (*i.e.* replacement of the wild-type allele in all chromosome copies) was confirmed by PCR (data not shown). Furthermore, RT-PCR analyses confirmed that SR10 only expressed the mutant allele encoding ValRS Δ CAAD, a version of ValRS lacking amino acids 830–919 encompassing the CAAD (not shown). By contrast to the wild-

FIGURE 1. **Cyanobacterial species containing CAAD-bearing aaRSs and features of the CAAD domain.** A, species containing aaRSs with the CAAD insertion, indicating the approximate position and length of the insertion. HFC, heterocyst-forming cyanobacteria. B, sequence logos from the HMM alignment of CAAD domains of cyanobacterial aaRSs (top) and the entire CAAD protein domain family (including CAAD domains of cyanobacterial aaRS and CAAD-like proteins from cyanobacteria and plants). The height of each letter (vertical axis) is proportional to the frequency (the most common is shown on top). The horizontal axis represents the position of residues used in the analysis. Secondary structural features are shown over each weblogo. The position of transmembrane helices (TM) is indicated by bars with discontinuous ends, indicating that the limits of the helices may vary depending on the prediction program used. C, phylogenetic guide tree of cyanobacterial species based on 16 S ribosomal sequences (CAT + GTR + I + 6I² evolutionary model). Highlighted species contain the CAAD domain in GluRS (green), ValRS (pink), LeuRS (yellow), or IleRS (orange).

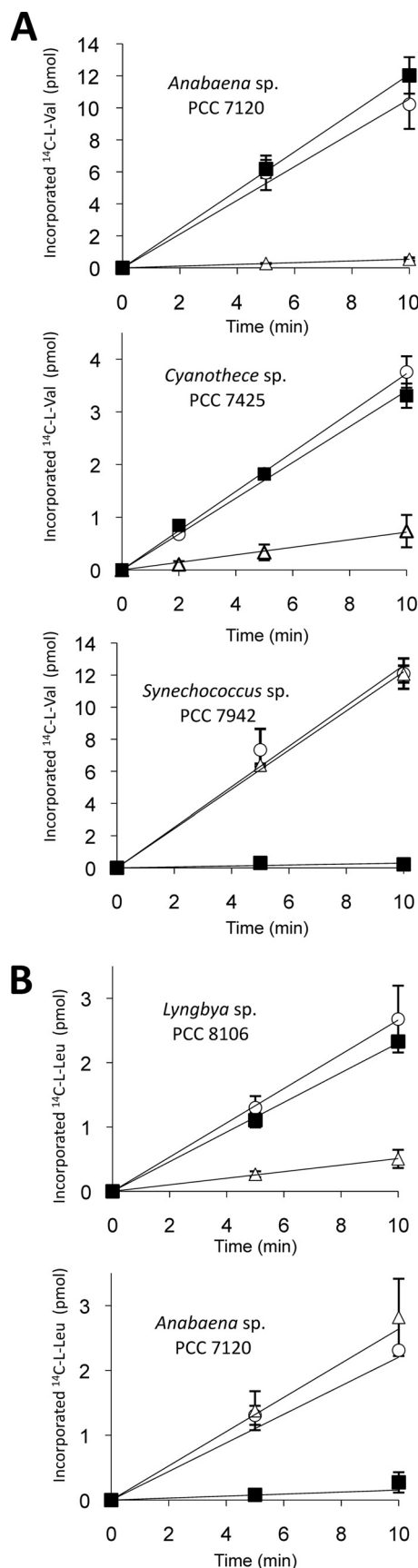


FIGURE 2. ValRS and LeuRS activity in fractionated extracts from cyanobacteria. A, incorporation of ^{14}C -labeled L-Val was measured in aminoacylation assays of cell extracts (open circles) or membrane preparations (squares)

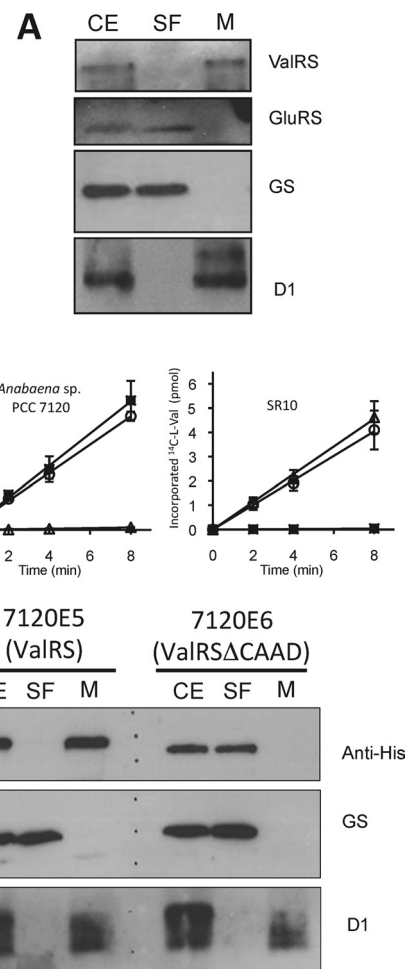


FIGURE 3. Localization of ValRS in fractionated extracts from *Anabaena* strains. A, aliquots of *Anabaena* cell extracts (CE) or membrane fractions (M) containing 1.1 μg of chlorophyll (75 μg of protein of the cell extract), or a similar volume of the soluble fraction (SF), were analyzed in Western blots probed with antibodies against *Anabaena* ValRS. Aliquots of *Anabaena* cell extracts or membrane fractions containing 0.15 μg of chlorophyll (10 μg of protein for the cell extract), or a similar volume of soluble fraction, were analyzed in Western blots probed with antibodies against GluRS, glutamine synthetase (GS), or the D1 protein of photosystem II. B, plots represent ValRS activity in fractionated extracts of wild-type *Anabaena* and the SR10 mutant: cell extracts (open circles), membrane fraction (squares), and the soluble fraction (open triangles). Other details are as described in the legend to Fig. 2. C, aliquots of cell extracts or the membrane fraction from 7120E5 and 7120E6 strains containing 0.57 or 0.023 μg of chlorophyll, or a similar volume of the soluble fractions, were analyzed in Western blots probed with commercial antibodies against polyhistidine. Aliquots of cell extracts or the membrane fraction from 7120E5 and 7120E6 strains containing 0.4 μg of chlorophyll, or a similar volume of the soluble fraction, were analyzed in Western blots probed with antibodies against GS or the D1 protein.

type strain in which ValRS activity was observed predominantly in the membrane fraction, in the SR10 mutant virtually all of this activity was detected in the soluble fraction (Fig. 3B).

containing 0.5–1.5 μg of chlorophyll, or using an equivalent volume of the soluble fraction (open triangles) from the indicated cyanobacterial strains. *Anabaena* tRNA^{Val}_{GAC} was used as the substrate for *Anabaena* and *Synechococcus*, and *Anabaena* tRNA^{Val}_{GAC} for *Cyanothece*. B, LeuRS activity was measured in cell extracts (open circles) or membrane preparations (squares) containing 0.06 μg of chlorophyll or an equivalent volume of the soluble fraction (open triangles) from the indicated cyanobacterial strains. *Lyngbya* tRNA^{Leu}_{CAG} was used as a substrate.

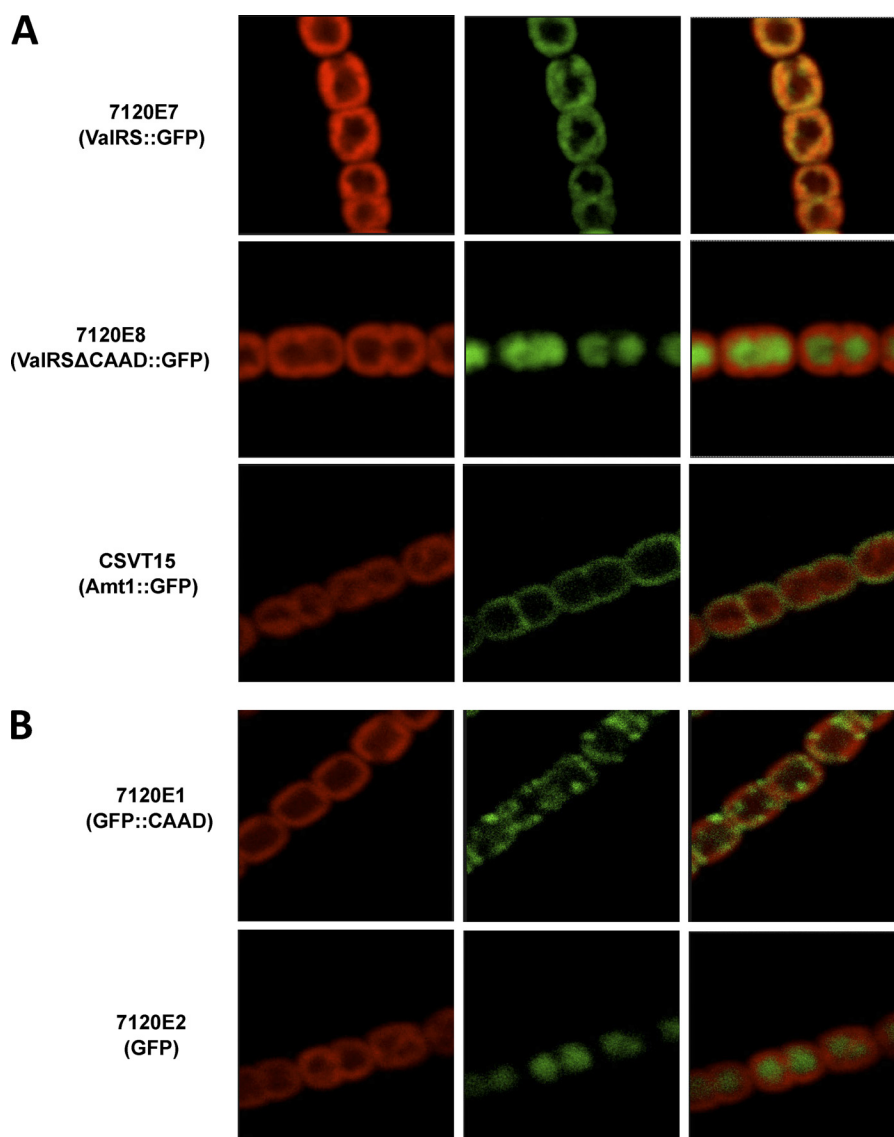


FIGURE 4. **Subcellular localization of GFP-fused proteins in *Anabaena* filaments.** *A* and *B*, filaments of the *Anabaena* strains (left) expressing the proteins indicated in parentheses were analyzed by confocal microscopy. Left panels show the red autofluorescence of photosynthetic pigments and the central panels show the green fluorescence of GFP. The panels on the right show the merged images of the left and central panels.

To further confirm these findings, two strains derived from *Anabaena*, 7120E5 and 7120E6, were constructed by inserting an extra copy of a recombinant *valS* gene into a replicative plasmid, encoding ValRS or ValRSΔCAAD fused to C-terminal histidine tags, respectively. The presence of ValRS was determined in each cell fraction using commercial antibodies against the histidine tag. Although ValRS::His was localized in the membrane fraction, ValRSΔCAAD::His was detected in the soluble fraction (Fig. 3C), which further indicated that the CAAD domain is required for the localization of ValRS to the membrane.

Cyanobacteria are photosynthetic bacteria that contain two independent membrane systems, the plasma membrane and the thylakoid membrane (50–54), the latter of which contains the photosynthetic apparatus. To determine whether CAAD-containing aaRSs are found in one or in both membrane systems, we constructed strains derived from *Anabaena* expressing ValRS or ValRSΔCAAD fused to the GFP marker protein

(strains 7120E7 and 7120E8, respectively) and they were analyzed by confocal microscopy. The fluorescence of the ValRS::GFP fusion protein (Fig. 4A, top center panel) co-localized perfectly with the red autofluorescence of the photosynthetic pigments of the thylakoid membranes (Fig. 4A, top left and right panels). By contrast, ValRSΔCAAD::GFP fluorescence was confined to the central part of the cytoplasm, and it was largely excluded from regions where thylakoids were detected, exhibiting a similar distribution to the soluble GFP protein in strain 7120E2 (Fig. 4, A, middle panels, B, bottom panels). Strain CSV15 expressing a fusion protein of the ammonium transporter Amt1 with GFP (55) was used as a control for plasma membrane localization. In this strain, the green fluorescence of GFP was observed surrounding the thylakoids (Fig. 4A, bottom panels). Thus, our results indicate that *Anabaena* ValRS is localized in the thylakoid membrane but not to the plasma membrane, and further demonstrates that CAAD is required for membrane anchoring of these enzymes.

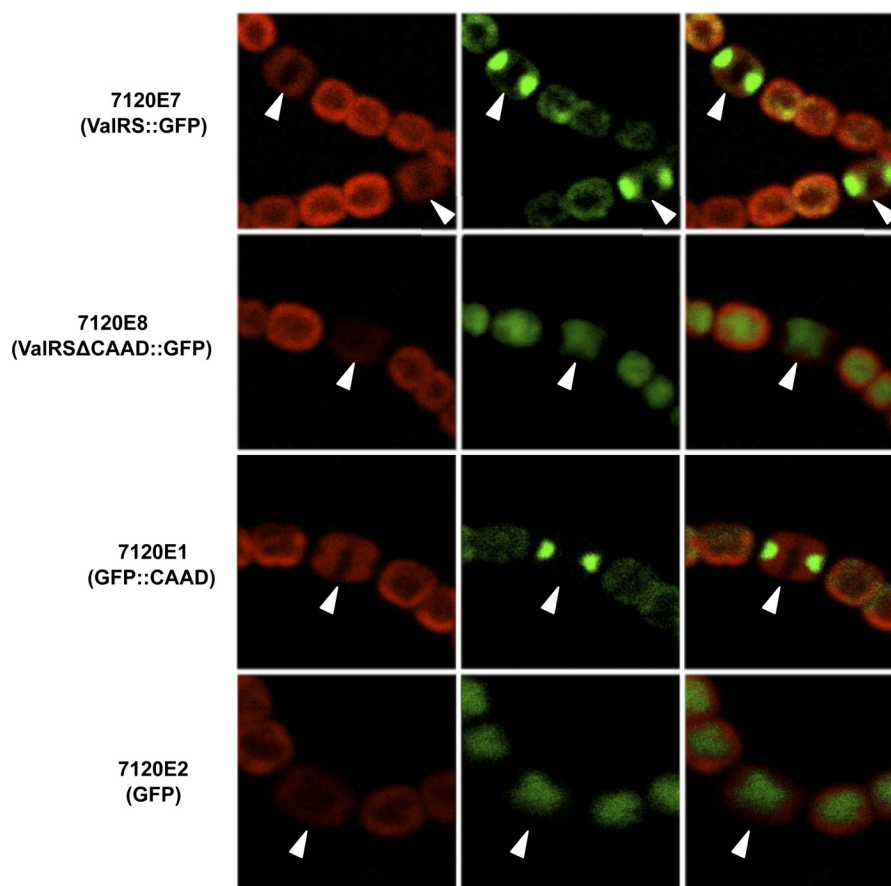


FIGURE 5. **Subcellular localization of GFP-fused proteins in heterocysts.** Confocal fluorescence microscopy of filaments from the *Anabaena* strains shown on the left that express the proteins indicated in parentheses and that were grown in bubbled cultures for 24 h in BG11₀ medium. Left panels show the red autofluorescence of photosynthetic pigments and the central panels show the green fluorescence of GFP. The panels on the right show the merged images of the left and central panels. Arrows point to heterocyst cells.

A GFP protein fused to the CAAD domain was also found to colocalize with the red fluorescence of the thylakoids, although in this case the GFP::CAAD pattern exhibited a patchy distribution (Fig. 4B, top panels). To further corroborate the localization of this protein in the thylakoid membrane, extracts of the 7120E1 strain expressing GFP::CAAD were fractionated by ultracentrifugation, resolved by SDS-PAGE, and the fluorescent proteins were detected by in-gel fluorescence in an Ettan DIGE scanner. The GFP::CAAD protein co-localized with chlorophyll in the membrane fraction (not shown), confirming its presence in the thylakoids. These results indicate that the CAAD domain is sufficient to direct an unrelated protein (GFP) to the thylakoid membrane. However, as the subcellular distribution of the GFP::CAAD protein is not identical to that of ValRS::GFP, we cannot rule out a potential contribution of sequences outside CAAD in conferring the localization.

Under certain nutritional conditions, *Anabaena* filaments are composed of two metabolically and morphologically distinct cell types (56–58). Cell differentiation is aimed to separate two incompatible metabolic functions, namely oxygenic photosynthesis and nitrogen fixation, by the confinement of each process in different cell types (57, 59). The differentiation of the cells called heterocysts is triggered by deprivation of nutritional sources of chemically combined nitrogen. These cells appear semi-regularly interspersed in the filament and, unlike the

intervening vegetative cells that perform oxygenic photosynthesis, they are mostly devoted to nitrogen fixation (59). To analyze the localization of the ValRS::GFP in heterocysts, filaments from the 7120E7, 7120E8, 7120E1, and 7120E2 strains were deprived of combined nitrogen for 24 h, which was sufficient to induce heterocyst differentiation in our laboratory conditions. Heterocysts were identified by their thicker morphology and weaker autofluorescence as compared with vegetative cells (Fig. 5). Surprisingly, ValRS::GFP and CAAD::GFP were confined to the poles of the cell in 7120E7 and 7120E1 heterocysts, respectively, whereas some areas of the thylakoid membranes occupying nonpolar positions were devoid of these proteins. The localization of these proteins in distinct cell fractions of the 7120E7 and 7120E1 filaments, containing an average of 1 heterocyst per 10–15 vegetative cells, was analyzed by cell fractionation and in-gel fluorescence following SDS-PAGE. Both proteins were detected exclusively in the membrane fraction, indicating that they are also anchored to membranes in heterocysts (not shown). By contrast, ValRSΔCAAD::GFP and GFP were detected in the central portion of the cytoplasm of heterocysts of the 7120E8 and 7120E2 strains, respectively (Fig. 5).

Impact of Membrane Localization of ValRS on Cell Fitness—To assess the physiological impact of the presence of aaRSs in the thylakoid membrane, we analyzed the wild-type strain and

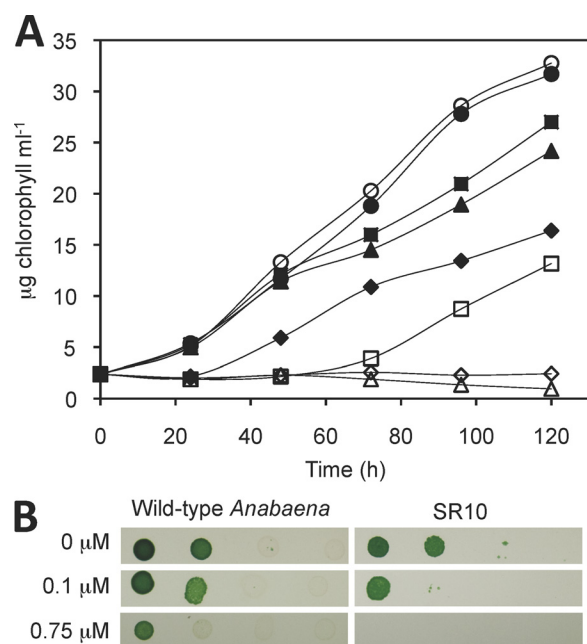


FIGURE 6. Growth of wild-type *Anabaena* and the SR10 mutant in the presence of MSX. A, curves represent growth as the chlorophyll content of cultures of wild-type *Anabaena* (closed symbols) and the SR10 mutant (open symbols), in the absence (circles) or presence of 1 (squares), 2.5 (triangles), or 5 μ M (diamonds) of MSX. A representative plot of three independent experiments is shown. B, serial dilutions of cultures of wild-type *Anabaena* and the SR10 mutant were spotted onto BG11-agar plates containing the concentration of MSX indicated on the left.

the SR10 mutant described above. No differences were observed in the frequency of heterocysts, their morphology, or the time required for vegetative cells to differentiate into heterocysts. Cell growth was tested in a variety of conditions including standard conditions, nitrogen fixation conditions, low, medium, or high incident light (50, 500, and 800 μ E $m^{-2} s^{-1}$, respectively), oxidative stress, and in the presence of sub-inhibitory concentrations of chloramphenicol, L-methionine sulfoximine (MSX), or sulfometuron methyl, a herbicide that inhibits the synthesis of branched-chain amino acids. No differences were observed in the growth rate of the wild-type and mutant strains, except when treated with MSX, an effective inhibitor of *Anabaena* glutamine synthetase (Fig. 6) (60, 61). Liquid cultures of SR10 exhibited a remarkable delay in growth with respect to wild-type controls in the presence of 1–5 μ M MSX, whereas higher concentrations impaired growth in both strains to a similar extent. In solid medium, SR10 was more sensitive to MSX concentrations as low as 0.1 μ M when compared with the wild-type controls.

DISCUSSION

Domain shuffling, involving the gain or loss of individual domains, is one of the major driving forces behind the molecular innovation of modular proteins, including aaRSs (62, 63). Novel appended domains may fuse or insert into pre-existing domains, provided that they do not disrupt the canonical function of the aaRS. The present findings indicate that the novel CAAD protein domain recruited by 4 distinct class I aaRSs is essential for membrane anchoring. To the best of our knowledge, these are the only known cases of membrane-bound aaRSs.

Evolution of the CAAD Domain—Our results indicate that the CAAD module has been recruited on multiple occasions by distinct aaRSs at different time points in evolution. CAAD-containing LeuRS or GluRS are each found in only one species, suggesting a recent recruitment event. By contrast, CAAD-containing ValRS is present in all species of the heterocyst-forming clade, suggesting a single event early in the divergence of this group, which is estimated to have occurred over 2 billion years ago (64). The mechanism by which CAAD domains were acquired is unknown. The existence of genes encoding single-domain CAAD-like proteins in cyanobacterial genomes suggests that the aaRSs hereby described originated from the insertion of one of these genes into the ORF of a class I aaRS. If this event were random, we would expect to find this domain inserted in other regions of the genome. However, we observed the recurrent acquisition of the domain by proteins with a related structure-function. This can be envisaged as a case of evolutionary convergence and suggests that adaptive pressure contributed to the formation of this combination of functional domains.

Sequence and Structural Features of the CAAD Domain—A major feature of the CAAD domain and CAAD-like proteins is the presence of three α -helices, including two transmembrane helices. Conserved features of CAAD also include an invariant Arg residue and a Lys-rich sequence immediately C-terminal to the second helix, which are probably topological determinants for correct insertion into the membrane. Indeed, positively charged residues are often found in the cytosolic side of membrane proteins flanking transmembrane helices, in accordance with the “positive inside rule” of von Heijne (65–67). These residues stabilize membrane binding by electrostatic interactions with the acidic head of phospholipids (68). The negatively charged residues at the loop connecting the two transmembrane helices may also be important for the correct orientation of the protein in the membrane (67). The lack of signal peptides in CAAD-bearing aaRSs and the position of this domain in the C-terminal portion of these proteins indicate that insertion in the membrane is most likely post-translational, as the CAAD domain has to exit the ribosome before insertion.

ValRS, LeuRS, and IleRS are closely related class I aaRSs, exhibiting a relatively high degree of conservation in both sequence and structure. In addition to the Rossmann-fold catalytic domain, these proteins have several common accessory domains, including the CP-1 domain for editing that is inserted into the catalytic domain and the helix bundle anticodon-binding domain (supplemental Fig. S2) (69–72). C-terminal to the helix bundle domain, ValRS and IleRS both contain an anticodon stem-binding domain (supplemental Figs. S2 and S3), which is absent in LeuRS (70–72). The C-terminal domain is idiosyncratic for each aaRS. Accordingly, ValRS contains a coiled-coil domain essential for aminoacylation, which contacts the external corner of the L-shaped tRNA, whereas IleRS contains a zinc-binding domain that contacts the anticodon wobble base, an identity determinant for tRNA^{Ile} (72–74), and LeuRS has a α , β -domain linked by a flexible tether that is required for its activity in bacteria (69, 75, 76). Insertion of CAAD occurs at domains C-terminal to the Rossmann-fold, far from the catalytic site in the primary and tertiary structure

(supplemental Figs. S2 and S3). In LeuRS, the CAAD is inserted into the helix bundle domain, whereas in IleRS the insertion splits the anticodon stem-binding domain. In ValRS, one of the insertions occurs in the loop connecting the helix bundle to the anticodon stem-binding domain, whereas the second insertion splits the latter domain in a manner similar to that observed in IleRS (supplemental Fig. S2). The site of CAAD insertion into the reported crystal structures of bacterial ValRS, IleRS, and LeuRS enzymes can be ascertained (69–72), although with some degree of ambiguity, due to sequence divergence (supplemental Figs. S2 and S3). In all cases the insertion site corresponds to superficial residues of the protein, on surfaces opposing the docking face for tRNA (supplemental Fig. S3). Thus, it is conceivable that in these three enzymes CAAD protrudes out of the main body of the protein, enabling the insertion of its two helices into the membrane, causing minimal disturbance to the overall structure of the synthetase, the folding of adjacent domains, and the docking of tRNA. The cytoplasmic residues of the CAAD probably act as flexible linkers connecting the transmembrane helices with the rest of the protein. In the case of GluRS, folding of the synthetase portion is not likely to be affected by CAAD due to the existence of a long (270 amino acids) intervening linker sequence. This is consistent with our observation that deletion of CAAD of *Anabaena* ValRS does not alter the kinetic parameters of the enzyme, including the k_{cat} and K_m values for tRNA^{Val}, L-Val, and ATP. Indeed, this suggests that CAAD does not participate in the aminoacylation reaction and that its insertion does not significantly change the overall conformation of the rest of the protein.

Function of the CAAD Domain—Our deletion experiments strongly suggest that CAAD is required for membrane anchoring of aaRSs. Although residues of ValRS outside CAAD may also be involved, at least part of the information required for membrane insertion must be contained in the CAAD sequence, because its fusion to an unrelated protein, such as GFP, is sufficient to target it to the membrane. Moreover, proteins containing CAAD, either aaRSs or the CAAD::GFP fusion protein, are specifically localized to the thylakoid membrane, and are absent or largely excluded from the plasma membrane. Hence, CAAD sequences appear to contain determinants for protein sorting to this structure. The localization of plant and cyanobacterial CAAD-like proteins in the thylakoid membrane further supports the proposed role of CAAD as a protein-sorting domain. The *Arabidopsis thaliana* protein, named TMP-14 or PSI-P, is found at the stromal side of the thylakoid membrane (70, 77). A cyanobacterial homologue of TMP14 has been shown to interact with the PsaL subunit of photosystem I and with HliC, an integral thylakoid membrane protein induced under light stress (78, 79). Although the subcellular localization of 2 CAAD-like proteins has been established, other functional information pertaining to these proteins could be useful to infer the putative metabolic or signaling function of the CAAD domain.

Cell Differentiation-induced Relocalization—In differentiated heterocysts of *Anabaena* sp. PCC 7120, ValRS concentrates in polar thylakoids (*i.e.* those next to the junction with a neighboring cell), whereas thylakoids in other regions of the cytoplasm are largely devoid of the enzyme. In mature hetero-

cysts of the *Nostoc* and *Anabaena* genera, polar accumulation of highly curved membranes, named honeycomb thylakoids, has been observed, whereas thylakoids in other parts of the cytoplasm exhibit a normal, less curved appearance (80). Our findings demonstrate the heterogeneous protein composition of thylakoid membranes in heterocysts, in turn suggesting the existence of sorting signals governing the localization of newly synthesized ValRS. Accumulation at the poles depends on the presence of CAAD, which is sufficient to direct an unrelated protein such GFP to this region. The poles of heterocysts are probably regions of high metabolic activity, as a significant portion of the exchange of metabolites with neighboring vegetative cells occurs through the septum (81), which may account for the observed localization of ValRS at heterocyst poles.

Impact of aaRS Membrane Anchoring on Cell Fitness—Domains appended to the catalytic domain of aaRSs mediate diverse activities, including tRNA binding, editing, or interaction with other proteins. The results of the present study ascribe a function to CAAD distinct from those previously described and suggest a dual role: a structural role as a membrane anchor and a sorting role, whereby proteins may be directed to specific subcellular localizations in different cell types. Membrane confinement of a single aaRS (or two in *T. erythraeum* cells) is intriguing and difficult to interpret intuitively. Cells of all three kingdoms of life are compartmentalized, with the most complex degree of compartmentalization observed in eukaryotic cells. In general, cell compartmentalization serves to localize cell components in environments appropriate for their function, to bring together functionally related molecules and thereby favor their interaction, or to separate and prevent the interaction of other molecules. The cyanobacterial aaRSs described here are compartmentalized in the thylakoid membrane, and undoubtedly prevented from diffusing in the cytoplasm. Nevertheless, membrane-anchored aaRSs appear to efficiently mediate translation given the success of many cyanobacteria that have carried these enzymes for billions of years. Our results indicate that the fitness of the SR10 *Anabaena* strain (containing a ValRS from which the CAAD domain is deleted) is similar to that of the wild-type in most conditions, except upon treatment with MSX. MSX impairs glutamine synthetase activity, provoking a shortage of nitrogenous compounds in the cell, including amino acids. Therefore, under conditions of nitrogen limitation, the presence of ValRS in the thylakoid membrane appears to be advantageous for the cell, permitting faster growth. It is tempting to speculate that the advantage of a defined localization in the membrane might be due to the proximity to other molecules required for aminoacylation or alternative functions. By contrast, a soluble enzyme (*e.g.* ValRS Δ CAAD) with a more dispersed localization would not have such ready access to functional partners. Although this difference may not be critical in most situations, it may be of great importance under particular conditions of stress associated with shortages of specific molecules or nutrients. In nature, nitrogen-fixing organisms such as *Anabaena* may be subjected to transient periods of nitrogen limitation similar to those induced by MSX treatment. One such example is when nitrogen limitation occurs concomitant with conditions that

compromise the synthesis of active nitrogenase enzyme (e.g. during shortages of iron or molybdenum).

The findings presented here do not rule out the possibility that membrane-bound aaRSs play additional metabolic or signaling roles in addition to their canonical aminoacylation function. Further studies are currently underway to address this issue.

Acknowledgments—We are indebted to A. M. Muro-Pastor for providing the pCSAM200 plasmid and E. Flores, A. Herrero, and V. Merino-Puerto for the CSVT15 strain. We thank A. Lindahl and M. I. Muro-Pastor for antibodies against D1 and GS proteins, and Ghada Ajlani and John Cobley for critical reading of the manuscript. The excellent technical assistance of Manuel Castro de Moura, Noelia Camacho Hinojosa, and members of Ribas de Pouplana's lab is also acknowledged.

REFERENCES

- Schimmel, P., and Ribas De Pouplana, L. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 207–209
- Banerjee, R., Chen, S., Dare, K., Gilreath, M., Praetorius-Ibba, M., Raina, M., Reynolds, N. M., Rogers, T., Roy, H., Yadavalli, S. S., and Ibba, M. (2010) *FEBS Lett.* **584**, 387–395
- Ibba, M., and Soll, D. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 617–650
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990) *Nature* **347**, 203–206
- Cusack, S. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 881–889
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Härtlein, M., Nassar, N., and Leberman, R. (1990) *Nature* **347**, 249–255
- Burbaum, J. J., and Schimmel, P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16965–16968
- Ribas de Pouplana, L., and Schimmel, P. (2000) *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 865–870
- Jasin, M., Regan, L., and Schimmel, P. (1983) *Nature* **306**, 441–447
- Delarue, M., and Moras, D. (1993) *Bioessays* **15**, 675–687
- Korencic, D., Ahel, I., Schelert, J., Sacher, M., Ruan, B., Stathopoulos, C., Blum, P., Ibba, M., and Söll, D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 10260–10265
- Wong, F. C., Beuning, P. J., Silvers, C., and Musier-Forsyth, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 52857–52864
- Guo, M., Schimmel, P., and Yang, X. L. (2010) *FEBS Lett.* **584**, 434–442
- Guo, M., Yang, X. L., and Schimmel, P. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 668–674
- Mirande, M. (2010) *FEBS Lett.* **584**, 443–447
- Cusack, S., Yaremchuk, A., and Tuko, M. (1997) in *The Many Faces of tRNA* (Eggleston, D. S., ed) pp. 55–64, Academic Press, London
- Ling, J., Reynolds, N., and Ibba, M. (2009) *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 61–78
- Park, S. G., Ewalt, K. L., and Kim, S. (2005) *Trends Biochem. Sci.* **30**, 569–574
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C. A., Chavatte, L., Kinter, M., Ting, S. M., Dignam, J. D., Kim, S., Driscoll, D. M., and Fox, P. L. (2004) *Cell* **119**, 195–208
- Ray, P. S., and Fox, P. L. (2007) *EMBO J.* **26**, 3360–3372
- Beebe, K., Ribas De Pouplana, L., and Schimmel, P. (2003) *EMBO J.* **22**, 668–675
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A. C., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Moras, D. (1999) *Cell* **97**, 371–381
- Luque, I., Riera-Alberola, M. L., Andújar, A., and Ochoa de Alda, J. A. (2008) *Mol. Biol. Evol.* **25**, 2369–2389
- Rippka, R. (1988) *Methods Enzymol.* **167**, 3–27
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (eds) (2010) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York
- Sobotka, R., McLean, S., Zuberova, M., Hunter, C. N., and Tichy, M. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 2086–2095
- Mackinney, G. (1941) *J. Biol. Chem.* **140**, 315–322
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E. (1978) *Anal. Biochem.* **87**, 206–210
- Luque, I., Andújar, A., Jia, L., Zabulon, G., de Marsac, N. T., Flores, E., and Houmard, J. (2006) *Mol. Microbiol.* **60**, 1276–1288
- Raczniak, G., Becker, H. D., Min, B., and Söll, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45862–45867
- Fersht, A. R., Ashford, J. S., Bruton, C. J., Jakes, R., Koch, G. L., and Hartley, B. S. (1975) *Biochemistry* **14**, 1–4
- Francklyn, C. S., First, E. A., Perona, J. J., and Hou, Y. M. (2008) *Methods* **44**, 100–118
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402
- Papadopoulos, J. S., and Agarwala, R. (2007) *Bioinformatics* **23**, 1073–1079
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009) *Bioinformatics* **25**, 1189–1191
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, 511–518
- Eddy, S. R. (2008) *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000069
- Néron, B., Ménager, H., Maufrais, C., Joly, N., Maupetit, J., Letort, S., Carrere, S., Tuffery, P., and Letondal, C. (2009) *Bioinformatics* **25**, 3005–3011
- Schneider, T. D., and Stephens, R. M. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 6097–6100
- Cole, C., Barber, J. D., and Barton, G. J. (2008) *Nucleic Acids Res.* **36**, W197–201
- Cuff, J. A., and Barton, G. J. (2000) *Proteins* **40**, 502–511
- Biegert, A., Mayer, C., Remmert, M., Söding, J., and Lupas, A. N. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**, W335–339
- Bryson, K., McGuffin, L. J., Marsden, R. L., Ward, J. J., Sodhi, J. S., and Jones, D. T. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, W36–38
- Simossis, V. A., and Heringa, J. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, W289–294
- Käll, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E. L. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, W429–432
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001) *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580
- Posada, D. (2009) *Methods Mol. Biol.* **537**, 93–112
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010) *Syst. Biol.* **59**, 307–321
- Lartillot, N., Lepage, T., and Blanquart, S. (2009) *Bioinformatics* **25**, 2286–2288
- Liberton, M., and Pakrasi, H. B. (2008) in *The Cyanobacteria, Molecular Biology, Genomics and Evolution* (Flores, E., and Herrero, A., eds) pp. 271–288, Caister Academic Press, Norfolk, UK
- Nevo, R., Charuvi, D., Shimon, E., Schwarz, R., Kaplan, A., Ohad, I., and Reich, Z. (2007) *EMBO J.* **26**, 1467–1473
- Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R., and Pakrasi, H. B. (2006) *Protoplasma* **227**, 129–138
- van de Meene, A. M., Hohmann-Marriott, M. F., Vermaas, W. F., and Roberson, R. W. (2006) *Arch. Microbiol.* **184**, 259–270
- Ting, C. S., Hsieh, C., Sundararaman, S., Mannella, C., and Marko, M. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 4485–4493
- Merino-Puerto, V., Mariscal, V., Mullineaux, C. W., Herrero, A., and Flores, E. (2010) *Mol. Microbiol.* **75**, 1159–1170
- Golden, J. W., and Yoon, H. S. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 557–563
- Flores, E., and Herrero, A. (2010) *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 39–50
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., Valladares, A., and Flores, E. (2004) *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 469–487
- Xu, X., Elhai, J., and Wolk, C. P. (2008) in *The Cyanobacteria, Molecular Biology, Genomics and Evolution* (Flores, E., and Herrero, A., eds) pp. 383–422, Caister Academic Press, Norfolk, UK
- Stewart, W. D., and Rowell, P. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 846–856
- Orr, J., and Haselkorn, R. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 13099–13104
- Trifonov, E. N., and Frenkel, Z. M. (2009) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 335–340
- Wolf, Y. I., Aravind, L., Grishin, N. V., and Koonin, E. V. (1999) *Genome*

- Res. **9**, 689–710
64. Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C. M., and Ohno, T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 5442–5447
65. von Heijne, G. (1986) *EMBO J.* **5**, 3021–3027
66. von Heijne, G., and Gavel, Y. (1988) *Eur. J. Biochem.* **174**, 671–678
67. Yuan, J., Zweers, J. C., van Dijk, J. M., and Dalbey, R. E. (2010) *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 179–199
68. Facey, S. J., and Kuhn, A. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 55–66
69. Tukalo, M., Yaremchuk, A., Fukunaga, R., Yokoyama, S., and Cusack, S. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 923–930
70. Fukai, S., Nureki, O., Sekine, S., Shimada, A., Tao, J., Vassilyev, D. G., and Yokoyama, S. (2000) *Cell* **103**, 793–803
71. Fukai, S., Nureki, O., Sekine, S., Shimada, A., Vassilyev, D. G., and Yokoyama, S. (2003) *RNA* **9**, 100–111
72. Silvian, L. F., Wang, J., and Steitz, T. A. (1999) *Science* **285**, 1074–1077
73. Senger, B., Auxilien, S., Englisch, U., Cramer, F., and Fasiolo, F. (1997) *Biochemistry* **36**, 8269–8275
74. Nureki, O., Vassilyev, D. G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T. L., Schimmel, P., and Yokoyama, S. (1998) *Science* **280**, 578–582
75. Hsu, J. L., and Martinis, S. A. (2008) *J. Mol. Biol.* **376**, 482–491
76. Hsu, J. L., Rho, S. B., Vannella, K. M., and Martinis, S. A. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 23075–23082
77. Hansson, M., and Vener, A. V. (2003) *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 550–559
78. Khrouchtchova, A., Hansson, M., Paakkari, V., Vainonen, J. P., Zhang, S., Jensen, P. E., Scheller, H. V., Vener, A. V., Aro, E. M., and Haldrup, A. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 4808–4812
79. Wang, Q., Jantaro, S., Lu, B., Majeed, W., Bailey, M., and He, Q. (2008) *Plant Physiol.* **147**, 1239–1250
80. Lang, N. J., and Fay, P. (1971) *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.* **178**, 193–203
81. Mullineaux, C. W., Mariscal, V., Nenninger, A., Khanum, H., Herrero, A., Flores, E., and Adams, D. G. (2008) *EMBO J.* **27**, 1299–1308